

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Variabilidad genética poblacional de alpacas *vicugna pacos* determinada por marcadores microsatélites en el Centro Piloto Munay Paqocha y del fundo Itita, Puno-Perú

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

AUTOR

Claudia Esther Yalta Macedo

Lima – Perú

2014

DEDICATORIA

*A mis padres Arnaldo y Lupe y a mis
hermanos Daniel, Sandra, Jere; quienes
siempre me alentaron a seguir adelante.*

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por darme fortalezas cada día, y bendecirme con una familia maravillosa.
- A mis padres Arnaldo Yalta Rengifo, Lupe Macedo García, mis hermanos Daniel, Sandra y Jeremías, que a pesar de las dificultades siempre me mostraron su apoyo.
- Al Ing. Eudosio Veli por su orientación, paciencia en el laboratorio y darme la oportunidad de realizar la presente tesis.
- A la Bióloga Adriana Vallejo por su constante apoyo y por las tardes de arepas y empanadas.
- A mi asesora Mag. Giovanna Sotil por su guía en la redacción de la presente tesis.
- A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología Molecular del INIA: Yeny, Fernando, Diógenes, Ricardo, y especialmente a Chechy, mi amiga por acompañarme en las alegrías y tristezas.
- Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) quienes me dieron la facilidad y me abrieron sus puertas para la realización de la presente tesis.
- A la SPAR (Sociedad Peruana de Criadores de Alpacas y Llamas Registradas) Macusani, especialmente a la presidenta Matilde Riquelme por facilitarnos la toma de muestras.
- Y al Proyecto FINCyT *Contrato* 066: “Mejoramiento de la precisión de la selección genética del diámetro de fibra usando filiación genética en alpacas huacayas del fundo Mallkini y el Centro Munay Paqocha”, Componente 2: “Pruebas de paternidad en alpacas basadas en protocolos de ADN” por el financiamiento de la presente tesis.

ABREVIATURAS

ADN	Desoxirribonucleid Acid (Ácido desoxirribonucleico)
°C	Grado Celsius
CSD	Camélidos sudamericanos Domésticos.
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Dithiothreitol
DS	Desviación Estándar
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
FAO	Food and Agriculture Organization. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
FINCyT	Financiamiento para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología
FIS	Índice de Fijación individuo-subpoblación
FST	Índice de Fijación subpoblación-total
He	Heterocigosidad esperada
Ho	Heterocigosidad observada
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agraria
MCMC	Cadena de Markov e Monte Carlo, del inglés Markov Chain Monte Carlo).
m.s.n.m	Metros Sobre el Nivel del Mar
mg	Miligramos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MP	Munay Paqocha
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la polimerasa)
PD	Poder de Discriminación
PE	Poder de Exclusión
PEC	Probabilidad de exclusion combinada
PIC.	Contenido de Información Polimórfica
PC	Probabilidad de Coincidencia
pmol	Picomol
r.p.m.	Revoluciones por minuto
Valor p	Nivel de significancia
SPAR	Sociedad Peruana de Alpaqueros Registrada
STR	Short Tandem Repeats
TE	Tris:EDTA
T° a	Temperatura de hibridación o anillamiento
U	Unidades
μl	Microlitros
uM	Micro Molar
UV	Ultravioleta
V	Voltios

INDICE GENERAL

	Pág.
1. INTRODUCCION	1
2. MARCO TEORICO	4
2.1 Origen y distribución	4
2.2 Marcadores Microsatélites	7
2.2.1 Clasificación de microsatélites STR.	9
2.2.2 Genotipificación por el método de automatización de regiones STR.	10
2.2.3 Problemas potenciales para el análisis de microsatélites	11
2.3 Medición de la variabilidad genética	13
2.3.1 Número de alelos	13
2.3.2 Número efectivo de alelos	14
2.3.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg	14
a. Prueba exacta de Fisher	15
b. Prueba de deficiencia y exceso de heterocigotos (Prueba U)	16
2.3.4 Heterocigosidad	17
2.3.5 índice de Fijación	18
2.4 Parámetros forenses y de paternidad	19
2.5 Estudios genético poblacional de camélidos sudamericanos Domésticos.	22
3. HIPOTESIS	25
4. OBJETIVOS	25
5. MATERIAL Y METODOS	26
5.1 Colecta del material biológico	26
5.2 Extracción de ADN genómico total.	28
5.2.1. Extracción de ADN a partir de sangre	28
5.2.1. Extracción de ADN a partir de folículos pilosos	28
5.3 Evaluación de las extracciones de ADN	29
5.4 Amplificación de los marcadores microsatélites	30
5.5. Análisis de datos	32
6. RESULTADOS	35
6.1 Extracciones de ADN a partir de sangre y folículo piloso	35
6.2. Parámetros indicativos de variabilidad genética	35
6.2.1 Identificación de alelos	35

6.2.2 Frecuencias alélicas	37
6.2.3 Equilibrio Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento	44
6.2.4 Heterocigosidad (Nei, 1984) y PIC	46
6.2.5 Índices de Fijación	48
6.3 Estimación de parámetros forenses y de paternidad	49
6.4. Asignación y simulación de paternidad /maternidad	52
7. DISCUSION	55
8. CONCLUSIONES	62
9. RECOMENDACIONES	63
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
11. GLOSARIO	74
12. ANEXOS	78

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Clasificación de microsatélites según el número de repeticiones	10
Tabla 2.	Población de alpacas huacaya analizadas procedentes de la provincia de Carabaya, departamento de Puno, Perú	26
Tabla 3.	Secuencias de los iniciadores seleccionados para la amplificación de microsatélites en alpacas <i>Vicugna pacos</i> .	31
Tabla 4.	Condiciones de amplificación de sistemas multiplex y simples utilizadas para el análisis de microsatélites en alpacas <i>Vicugna pacos</i>	32
Tabla 5.	Número total de alelos por rebaño de alpacas del Centro Munay Paqocha (MP) y del Fundo Itita	37
Tabla 6.	Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) evaluado mediante la prueba exacta para cada locus en las poblaciones del Centro Munay Paqocha, Itita y total	45
Tabla 7.	Estimación de heterocigosidad de Nei 1984, PIC, calculadas para las poblaciones del Fundo Itita, Centro Munay Paqocha y total	47
Tabla 8.	Índice de Fijación (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) calculadas para la población Total, Fundo Itita y el Centro Munay Paqocha evaluado mediante marcadores STR.	48
Tabla 9.	Probabilidades de exclusión combinada para los 10 microsatélites.	50
Tabla 10.	Probabilidad de exclusión combinada (PEC) en términos de número de microsatélites usados ordenados de mayor a menor PE.	51
Tabla 11.	Relación de Asignación de Paternidad en el centro Munay Paqocha.	53
Tabla 12.	Relación de Asignación de Paternidad en el Fundo Itita.	54
ANEXO I.	Condiciones de amplificación en sistemas multiplex y simples para los 10 marcadores SSR	77
ANEXO II.	Concentración de ADN final (diluciones) de muestras de sangre y folículos pilosos	78
ANEXO III	Tablas de frecuencias alélicas (%) registradas para los marcadores SSRs en alpacas huacaya blancas del Centro Munay Paqocha (MP) y del Fundo Itita	79

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribución geográfica de la población de Alpacas por departamentos del Perú	7
Figura 2. Mecanismo principal para la generación de picos <i>stutters</i> ocasionado en la replicación normal	12
Figura 3. Esquema de la adición de adenina en humanos.	13
Figura 4. Mapa de la ubicación geográfica de los centros de reproducción de alpacas.	27
Figura 5. Procedimiento de colecta de muestras de alpacas huacayas blanca	29
Figura 6. Gel de agarosa (1%) de las extracciones de ADN genómico total	35
Figura 7. Electroferograma de microsatélites en alpacas obtenidos utilizando fluoróforos.	36
Figura 8. Distribución de las frecuencias alélicas del locus LCA37 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita.	38
Figura 9. Distribución de frecuencias alélicas del locus LCA 05 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita.	38
Figura 10. Distribución de frecuencias alélicas del locus LCA 66 de alpacas huacayas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita.	39
Figura 11. Distribución de frecuencias alélicas del locus LCA 08 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita.	40
Figura 12. Distribución de frecuencias alélicas del locus LCA 90 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita.	40
Figura 13. Distribución de frecuencias alélicas del locus LCA 94 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita	41
Figura 14. Distribución de frecuencias alélicas del locus VOLP92 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita	42
Figura 15. Distribución de frecuencias alélicas del locus YWLL36 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita	42
Figura 16. Distribución de frecuencias alélicas del locus YWLL44 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita	43
Figura 17. Distribución de frecuencias alélicas del locus YWLL08 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita.	44

ABSTRACT

In order to contribute to breeding programs for camelids, we sought to determine the genetic variability and the inbreeding level in two herds of breeding alpacas (*Vicugna pacos*) white huacayas newly formed belonging to the Pilot Center for Genetic Improvement Munay Paqocha and Fundo Itita of the Peruvian Society of Llamas and Alpacas Breeders (SPAR) Puno; and achieve their genotyping and identification of STR markers useful for the determination of paternity and kinship testing. 10 STR markers were assessed from blood and hair follicles of 183 individuals randomly collected. The total population had a high level of allelic variability, and unique alleles among populations with frequencies less than 1.5% in the loci LCA37, LCA90, LCA5, VOLP92, YWLL36, YWLL44 and YWLL08. In this study, the use of three markers, VOLP92, LCA94, LCA90, for genetic variability analysis in alpacas is proposed. F_{IS} (0.016) and F_{ST} (0.003) values reflected low levels of inbreeding. The Fundo Itita herd had a higher H_o (0.858) with respect to H_e (0.848), on the contrary the herd of Munay Paqocha Center presented a lower value of H_o (0.815) with respect to H_e (0.848), with trending heterozygote deficit. The 10 markers showed an appropriate exclusion relationship probability, with a value greater than 99.9% when the genotype of both parents was known, and a power of greater than 0.90 discrimination. In addition, a PEC value of 0.999 was reached considering only markers YWLL08, YWLL44, LCA37, YWLL36, LCA8; YWLL08 being the highest value (0.885). Filiation test detected major errors of maternity (13.04%) and paternity allowance (30.4%) in the herd Itita Fundo, Munay Paqocha with respect to errors designation maternity 7.69% and paternity of 17.95%, concluding that this center has a better record of matings.

Keywords: STR, camelids, heterozygosity, inbreeding coefficient, probability of exclusion.

RESUMEN

Con la finalidad de contribuir a los programas de mejoramiento genético para camélidos sudamericanos, se buscó determinar la variabilidad genética y el nivel de endogamia de dos rebaños de reproducción de alpacas (*Vicugna pacos*) huacayas blancas de reciente formación, pertenecientes al Centro Piloto de Mejoramiento Genético Munay Paqocha y el Fundo Itita, de la Sociedad Peruana de Criadores de Alpacas y Llamas (SPAR)-Puno; así como realizar su genotipificación e identificación de marcadores STR útiles para la determinación de pruebas de paternidad y parentesco. Se evaluaron 10 marcadores STR a partir de sangre y folículos pilosos de 183 individuos colectados al azar. El total de la población presentó un alto nivel de variabilidad alélica, y alelos exclusivos entre poblaciones con frecuencias menores al 1,5%, en los loci LCA37, LCA90, LCA5, VOLP92, YWLL36, YWLL44 y YWLL08. En este estudio se propone el uso de tres marcadores adicionales, VOLP92, LCA94, LCA90, para los análisis de variabilidad genética en alpacas. Los valores de F_{IS} (0,016), y F_{ST} (0,003) reflejaron bajo niveles de endogamia. El rebaño del Fundo Itita presentó una mayor H_o (0,858) respecto a la H_e (0,848), mientras que por el contrario el rebaño del Centro Munay Paqocha presentó un menor valor de la H_o (0,815) respecto a la H_e (0,848), con una tendencia al déficit de heterocigotos. Los 10 marcadores presentaron una probabilidad de exclusión de parentesco adecuada, con un valor superior al 99,9%, cuando se conoce el genotipo de ambos padres, y un poder de discriminación mayor a 0,90. Además, se alcanzó un valor PEC de 0,999 considerando solo los marcadores YWLL08, YWLL44, LCA37, YWLL36, LCA8; siendo YWLL08 el de mayor valor (0,885). La prueba de filiación permitió detectar mayores errores de asignación de maternidad (13,04%) y paternidad (30,4%) en el rebaño del Fundo Itita, respecto al Munay Paqocha con errores de designación de maternidad de 7,69% y de paternidad de 17,95%, concluyendo que este centro posee un mejor registro de empadres.

Palabras clave: STR, camélidos sudamericanos, heterocigosidad, coeficiente de endogamia, probabilidad de exclusión



“Macusani, hoy como ayer, manantial inagotable de donde brotan las alpacas que van a poblar los andes del Perú y del Mundo”.

Julio Barreda A.

1. INTRODUCCIÓN

La alpaca *Vicugna pacos* es uno de los cuatro camélidos sudamericanos más importante desde el punto de vista económico y social, ya que el uso de sus productos sirven de sustento para las familias de las comunidades alto andinas (FAO, 2005). El recurso principalmente aprovechado es la fibra de alpaca, sin embargo las deficiencias en los sistemas de crianza tradicional han contribuido con la disminución de la calidad productiva de los animales (peso, talla, vellón y finura de fibra), volviéndolos menos competitivos en el mercado internacional. Debido a esto, las asociaciones de criadores han incrementado las iniciativas para el desarrollo de programas de mejora genética, orientadas al blanqueamiento y finura de fibra. No obstante, a la fecha se tienen pocos avances, debido principalmente a la sobreestimación de los valores de cría producto de las deficiencias en la identificación de los animales como la pérdida de aretes y la falta de adecuados registros genealógicos. Se considera necesario que los animales seleccionados para el empadre deban de someterse a la verificación de paternidad a fin de obtener predicciones confiables en la estimación de caracteres cuantitativos, por lo que se requiere de la organización de bases de datos, con una estructura de información completa y confiable del pedigrí para evitar apareamientos entre individuos emparentados (endogamia). Estos inadecuados registros genealógicos conducen a un incremento considerable en los estimadores de correlación genética (FAO, 2010; Velarde, 2011). Así, la adquisición de un progenitor cuyos valores genéticos aditivos como peso de nacimiento, cantidad de vellón, entre otros, se encuentran sobreestimados y puede conducir a la disminución de la ganancia genética del rebaño.

En este contexto, el conocer la variabilidad genética poblacional es una condición necesaria para el mejoramiento de los caracteres de interés. Se ha encontrado que la disminución de la variabilidad por el aumento del nivel de endogamia puede causar la expresión de defectos congénitos y hereditarios, muy frecuentes en rebaños de fibra blanca, tales como prognatismo, polidactilia, ojos zarcos (Briones & Valdivia, 1985; Huanca *et al.*, 2007).

Los marcadores moleculares basados en el análisis del ADN han permitido solucionar estos problemas de asignación y verificación de progenitores, así como en la evaluación de la variabilidad genética y el monitoreo de los niveles de endogamia. Los microsatélites (STRs) son secuencias cortas repetitivas, distribuidas en todo el genoma, que debido a su alta tasa de mutación y su naturaleza codominante, permite la estimación de la diversidad genética entre y dentro de poblaciones. Diversos autores informan sobre la aplicación de STRs para la estimación de la diversidad genética, identificación de individuos, control de filiación en diferentes especies domésticas de importancia económica, como en ovejas (Pariset *et al.*, 2003, Tolone *et al.*, 2012), bovinos (Chikhi *et al.*, 2004; Egito *et al.*, 2007), cerdos (Laval *et al.*, 2000); para garantizar la fiabilidad de los documentos genealógicos (Jianlin *et al.*, 2000), con fines de conservación y mejora genética (Mburu, 2003). Por lo tanto, el presente trabajo buscó determinar la variabilidad genética y realizar la genotipificación de dos rebaños de reproductores de alpacas huacayas blancas pertenecientes al Centro Piloto de Mejoramiento Genético Munay Paqocha y el Fundo Itita, de la Sociedad Peruana de Criadores de Alpacas y Llamas (SPAR)-Puno. Así mismo, se buscó determinar el nivel de endogamia, y la identificación de marcadores STR que sirvan de herramienta para la determinación de pruebas de paternidad y parentesco a fin de

contribuir en programas de mejoramiento genético para camélidos sudamericanos.

2. MARCO TEORICO

2.1 Origen y distribución

Los camélidos se encuentran clasificados dentro del

Phylum Cordata
Clase *Mammalia*
Orden *Artiodactyla*,
Suborden *Tylopoda*
Familia *Camelidae*
Tribu Camelini
Género Camelus
C. dromedarius
C. bactrianus
Tribu Lamini
Genero Lama
L. guanicoe
L. guanicoe casciliensis
L. guanicoe guanicoe
L. glama
Genero Vicugna
V. Vicugna
V. vicugna mensalis
V. vicugna vicugna
V.pacos

La tribu Camelini habita en las zonas desérticas de Asia y África, se les conoce como los camélidos del Viejo Mundo y se conforman por dos especies del género Camelus: *C. dromedarius* (una joroba) distribuidos por las zonas áridas del Continente Africano, y el *C. bactrianus* (dos jorobas) localizados en China y Mongolia. La tribu Lamini habita en América del Sur a lo largo de la cordillera de los Andes y se les conoce como los camélidos del Nuevo Mundo o camélidos sudamericanos (CSA). Dentro de esta tribu se encuentran los géneros Lama y Vicugna. Existen cuatro especies en Sudamérica, de los cuales dos son silvestres y dos domésticas. Entre las especies silvestres se encuentran el guanaco *Lama guanicoe* y la vicuña *Vicugna vicugna*. El guanaco presenta las subespecies

Lama guanicoe casciliencis y *L. guanicoe guanicoe* (González *et al.*, 2006), la vicuña también presenta dos subespecies *Vicugna vicugna mensalis* y *V. vicugna vicugna*. En cuanto a las especies domésticas están conformados por la alpaca *Vicugna pacos* y a la llama *Lama glama*. La alpaca presenta dos razas huacaya y suri; y la llama las dos variedades Chaku y Q'ara.

Los camélidos tuvieron su origen hace más de 40 millones de años en América del Norte, durante el Eoceno, y la división entre tribu Lamini y Camelini sucedió hace aproximadamente 11 millones de años. A partir de la tribu Lamini apareció el género *Hemiauchenia* (10 millones de años), algunas especies de este género migraron hacia América del Sur y paralelamente hacia Asia hace 3 millones de años durante la transición del Plioceno al Pleistoceno (Wheeler *et al.*, 2006). En América del Sur, la separación entre los géneros *Lama* y *Vicugna* ocurrió aproximadamente hace dos millones de años (Wheeler, 1995). Posteriormente, evidencias arqueológicas revelaron que la domesticación de la alpaca sucedió hace 600 mil años en los Andes centrales (refugio de Telermarchay-Junín) y a partir de esta región fueron movilizándose hacia los valles interandinos llegando hasta la costa, proceso que culminó con el pastoreo hace más de 3500 a.C. Casi todas las culturas pre-incas utilizaron camélidos para su alimentación y vestimenta; fueron los incas quienes realizaron un tipo de selección de crías, separando los rebaños en función a sus colores (Wheeler, 1995). Durante la colonización, la introducción de ganado foráneo causó el desplazamiento de las alpacas desde la costa y valles interandinos hacia las zonas altoandinas.

La raza suri se encuentra casi exclusivamente en el Perú que, en comparación con la raza huacaya, presenta una mayor incidencia de mortalidad, menor robustez y susceptibilidad a los cambios ambientales. Corporalmente es de menor

tamaño y de líneas rectas y angulosas. La fibra carece de ondulación, cayendo hacia ambos lados del cuerpo, es más fina, pesada, brillante, suave y generalmente alcanza una mayor longitud. La raza Huacaya es la más abundante en el mundo (90% de las alpacas), y es más rústica que la suri; tiene mayor resistencia al medio, estando bien adaptadas al clima frío. Las orejas son pequeñas, verticales y puntiagudas, tienen el pabellón enroscado y están recubiertas externamente de lana corta e internamente de pelos finos, la fibra es rizada, dando al animal una apariencia esponjosa. Tiene un promedio de vida de 11 años, aunque no es poco frecuente observar animales de 16 a 18 años en plena producción y fecundidad. El tiempo de gestación es de 11 meses y medio (345 días) pero existen algunas variaciones con valores que oscilan entre 335 y 365 días (Ponzoni, 1996).

Otra característica importante de los camélidos sudamericanos es que no presentan rasgos de dimorfismo sexual, pues todos los camélidos actuales poseen un mismo número de cromosomas ($2n=74$); esto ha permitido el cruce entre estas especies generando híbridos como el huarizo que es el producto del cruce entre llama macho y alpaca hembra, o el pacovicuña que es el resultado del cruce entre una alpaca hembra y una vicuña macho.

La distribución de las alpacas a nivel mundial se ha desarrollado desde los años 80, con la crianza más intensa en los países de Australia (16,700 cabezas) y EE.UU (35,783 cabezas). En América del Sur, además de Perú, las alpacas se encuentran distribuidas en Chile, Ecuador, Argentina, Bolivia (Brenes, 2001).

El Perú es el principal productor de camélidos sudamericanos del mundo con poco más de 5 000 000 de cabezas entre las cuatro especies, de las cuales 3 685,5 son alpacas y representan más del 85% de las existentes en el mundo. Las

alpacas huacayas representa el 80,4% del total, seguida de la raza suri con 12,2% y Cruzados con 7,3%. Las alpacas se encuentran distribuidas en mayor proporción en la zona sur del Perú, a una altitud entre 3800 y 5000 msnm, con una temperatura promedio de 6 °C, siendo el departamento de Puno el que posee la mayor población (147 821 cabezas), seguida por Cuzco (517 965 cabezas), Arequipa (477 851 cabezas) Apurímac (224 855 cabezas), Huancavelica (302 609 cabezas), Moquegua (1126 134 cabezas), Pasco (147 821 cabezas) (Figura 1) (IV CENAGRO, 2012).

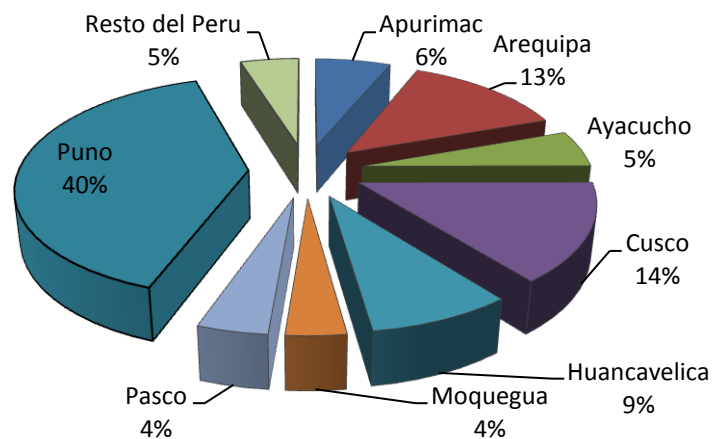


Figura 1. Distribución geográfica poblacional de alpacas en los departamentos del Perú. Fuente: IV CENAGRO, 2012.

2.2. Marcadores Microsatélites

Los marcadores pueden ser de naturaleza muy diversa, con diferencias en el método de detección, las tasas de mutación, mecanismos de expresión, polimorfismo, etc. Un marcador molecular, tipo microsatélites, debe reunir ciertas características para maximizar su utilidad tales como, estar distribuido a lo largo del genoma, tener un alto grado de polimorfismo, ser de rápido análisis, práctico y

con alto nivel de repetitividad (Cheng y Crittenden, 1994; Chambers y MacAvoy, 2000).

Los microsatélites son marcadores de ADN que consisten en secuencias pequeñas de 1 a 6 nucleótidos adyacentes, repetidas en tándem, el número de repeticiones puede variar entre individuos y el perfil genético es único, estas secuencias presentes en mayor proporción en regiones no codificantes, y con baja frecuencia en las regiones codificantes o también en telómeros, asociada a enfermedades (Arcot *et al.*, 1995; Chambers y MacAvoy, 2000; Oliveira *et al.*, 2006).

En general, los microsatélites presentan ciertas ventajas con respecto a otros marcadores tales como:

- a)** Son fácilmente amplificables a través de la PCR, incluso cuando se tienen escasas muestras biológicas o muy degradadas (Kloosterman y Kersbergen, 2003; Buckleton & Gill, 2005)
- b)** El resultado de la amplificación es visible mediante geles de poliacrilamida o mediante secuenciadores automáticos.
- c)** La caracterización en pares de bases de los alelos es sencilla.
- d)** Poseen un elevado polimorfismo como consecuencia de una alta tasa de mutación, importante para estudios de poblaciones con endogamia o estrechamente relacionadas.
- e)** Las regiones flanqueantes de los microsatélites se encuentran bastante conservadas desde el punto de vista evolutivo, de modo que unos microsatélites descubiertos en una especie pueden ser amplificados con éxito en otra especie del mismo género (Isagi y Suhandono, 1997), o aún

para diferentes géneros en una misma familia (Primmer y Merilä, 2002) aunque el nivel de polimorfismo encontrado no sea el mismo.

- f) Son marcadores codominantes, esto quiere decir que se pueden distinguir los individuos homocigotos de los heterocigotos (Beaumont & Bruford, 1999).

El uso de microsatélites tiene una amplia aplicación en la identificación individual, análisis de paternidad y parentesco. Los microsatélites, por sus características antes mencionadas, ofrecen excelentes resultados (Carling *et al.*, 2003; Agapito *et al.*, 2008) en la construcción de mapas genéticos de la mayoría de las especies (Crawford *et al.*, 1995; Dietrich *et al.*, 1996), en estudios de genética poblacional y de conservación en plantas y animales (Aranguren-Méndez & Jordana, 2001).

2.2.1. Clasificación de microsatélites.

Los STRs (Short Tandem Repeats) se definen por el tipo particular de secuencia o unidades de repetición y por su longitud o número de repeticiones en una posición concreta en el cromosoma. Bajo estos criterios se encuentran clasificados (Tabla 1) en los denominados **perfectos o puros**, que son repeticiones en un número mínimo de 9 unidades sin interrupción; los **compuestos** que tienen dos o más repeticiones de al menos 9 unidades, y también pueden ser combinaciones de motivos de un número variable de pares de bases conocidos como **interrumpidos**, que son repeticiones ininterrumpidas de al menos 9 unidades separadas como máximo por 4 pares de bases, y por último **complejo**, puede ser utilizado para especificar que dos o más unidades repetitivas diferentes, dentro de cada una de estas clasificaciones se encuentran

sus propias variantes (Weber, 1990; Buchanan, 1998; Chambers y MacAvoy, 2000).

Tabla 1. Clasificación de microsatélites según el número de repeticiones

CLASIFICACIÓN	SECUENCIA
Perfectos o puros	$-(CA)_n-$
Interrumpidos puros	$-(CA)_n-Nt-(CA)_n \text{ } Nt-(CA)_n -$
Compuestos	$-(CA)_n-(GA)_m-$
Interrumpidos compuestos	$-(AC)_{14}-AG-AA-(AG)_{12}-$
Complejo	$(TTTC)_{3-4}-(T)_6-(CT)_{0-1}-(CYKY)_n-CTCC-$ $(TTCC)_{2-4}$
Donde n, m >9	

2.2.2 Genotipificación por el método de automatización de regiones STR.

Para la separación de los fragmentos de microsatélites, la electroforesis vertical en geles de poliacrilamida es una opción de análisis de bajo costo, sin embargo tiene inconvenientes por ser una técnica más laboriosa, con menor repetitividad en los resultados e imposibilidad de realizar sistemas multiplex cuando los productos de amplificación son del mismo tamaño. Cuando se necesita trabajar con gran cantidad de muestras se debe recurrir a técnicas rápidas como el uso de aparatos que trabajan con capilares, conocidos como secuenciadores automáticos. Esta técnica presenta mayor sensibilidad en la detección de nuevos alelos (Butler, 2005), y utiliza fragmentos marcados con fluoróforos, unidos por el extremo 5' del cebador.

En la actualidad es posible trabajar con varios fluoróforos simultáneamente, encontrándose entre los más frecuentes el FAM, HEX, NED, VIC, TAMRA y un marcador interno permitiendo de esta manera analizar cada locus con diferentes

fluoróforos. Proporcionando una ventaja porque permite una mayor automatización del proceso, con menos requerimiento de mano de obra. Los fluoróforos son activados por un laser pasando de un estado de baja energía a un estado de excitación; la energía de la luz emitida es captada y convertida por una cámara CCD a una señal electrónica que es proporcional a la cantidad de luz emitida por las moléculas fluorescentes, luego es detectado por un dispositivo fotosensible que mide la intensidad de luz emitida, esta intensidad de luz se expresa en unidades arbitrarias tales como unidades relativas de fluorescencia (URFs) (Butler, 2005 y 2009). La información es transferida a un computador para su procesamiento y se visualiza en forma de electroferograma, donde cada pico representa un fragmento. Los picos que aparecen tienen asignado un color diferente dependiendo de los fluoróforos presentes, y además es posible conocer el tamaño en pares de bases de cada pico, su altura y su área, que van a ser reflejo de la cantidad de copias amplificadas.

2.2.3 Problemas potenciales en el análisis de microsatélites.

Durante la amplificación por PCR, los alelos pueden sufrir fenómenos conocidos como “artefactos”, que pueden interferir en la interpretación y en la genotipificación de los alelos presentes en el ADN. Los más comunes son los picos *stutter*, la presencia de alelos nulos y la adición de un nucleótido (Pompanon *et al.*, 2005).

Los picos *stutter* (picos fantasmas o tartamudos) son amplicones con una o más unidades repetidas respecto al verdadero alelo, y surgen en la PCR debido a un deslizamiento de la polimerasa (*strand slippage*) durante la extensión de la cadena de ADN naciente (Walsh *et al.*, 1996). Estos se pueden identificar cuando

el tamaño es menor del 15% del pico principal y es dependiente de la estructura de la repeticiones donde las más pequeñas (di y tri nucleótidos) son más propensas a la formación de estas bandas o picos que las repeticiones más complejas (tetra y penta nucleótido) (Moretti *et al.*, 2001; Munyard *et al.*, 2009).

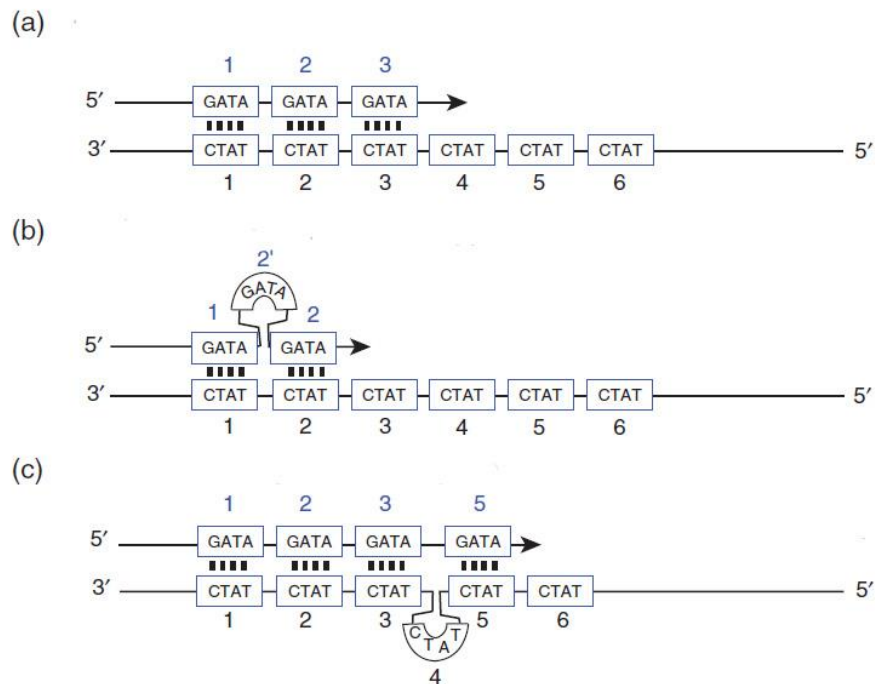


Figura 2. Mecanismo principal de la generación de picos *stutters* (a) ocasionado en la replicación normal, (b) Inserción por deslizamiento de la polimerasa sentido y (c) delección causada por el deslizamiento en la cadena antisentido. (Fuente: Butler 2005).

Otro de los artefactos a ocurrir es la adición de adeninas. La mayor parte de las polimerasas comerciales tienen la característica especial de añadir este nucleótido al final de los fragmentos amplificados, sin embargo esta situación depende del tiempo de extensión y de la cantidad de fragmentos generados. Puede ocurrir que haya fragmentos con adenina final y otros sin ella, entorpeciendo la identificación de los alelos. (Brownstein *et al.*, 1996).

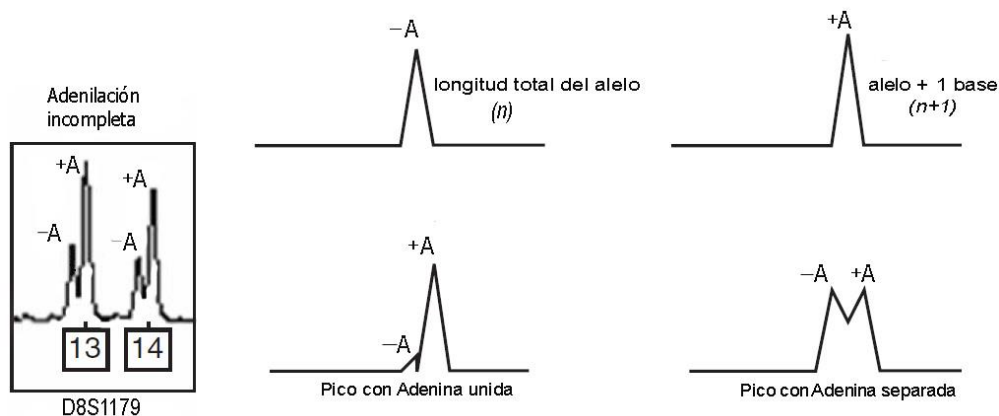


Figura 3. Esquema de la adición de adenina en humanos (Fuente: Butler ,2009)

Por otro lado, los alelos nulos son artefactos que suceden cuando no amplifica uno de los alelos debido a la mutación ocurrida en el sitio de adhesión del iniciador, ocasionando una mayor proporción de homocigotos (Dakin y Avise, 2004). Otra posible causa incluye la amplificación preferencial de alelos cortos debido a la inconsistencia de la calidad y cantidad del ADN molde o deslizamiento de la enzima durante la amplificación (Gagneux *et al.*, 1997; Shinde *et al.*, 2003).

2.3 Medición de la variabilidad genética

2.3.1 Número de alelos

El número de alelos (a_j) corresponde a la cantidad de alelos diferentes en un locus j variando en un intervalo de $1 < k < a_j$. El número total de alelos es la suma total de alelos de los n loci estudiados dentro de la población i , obtenido por:

$$A = \sum a_j$$

2.3.2 Número efectivo de alelos

Se define como la probabilidad de que dos alelos de un locus elegido al azar en la población sean idénticos por descendencia (Frankham *et al.*, 2002), es decir, es la proporción de alelos que tienen una mayor probabilidad de transmitirse a la siguiente generación. Esta probabilidad es igual al inverso de la frecuencia esperada de individuos homocigotos en la población y se calcula mediante la expresión:

$$Ae = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{1-He}$$

Donde: p_i : frecuencia del i-esimo alelo en un locus

He : heterocigosidad esperada en un locus

2.3.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg

La ley de Hardy–Weinberg establece que en una población grande, de apareamiento aleatorio, sin selección, mutación, ni migración, las frecuencias genotípicas y alélicas son constantes de generación en generación y que además tienen una relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas. Si la proporción de genotipos para un locus no está en equilibrio H-W en algunas poblaciones podría deberse a efecto de una selección sobre la población en cuestión o bien a la existencia de alelos nulos (Chakraborty *et al.*, 1992); mientras que si se desvía significativamente EHW para un número independiente de loci dentro de la población podríamos decir que existen subdivisiones, que podrían deberse a migración o a un flujo de genes de una fuente externa.

a. Prueba exacta de Fisher

Esta prueba tiene como objetivo verificar si la información (alélicas o genotípicas) de una muestra o población puede ser utilizada para rechazar una hipótesis, se considera un arreglo de los números de individuos de las clases genotípicas de un locus j proveniente de N_i individuos muestreados en una población i . La tabla de contingencia construida es de dimensión $k \times k$, donde k es el número de alelos para un locus considerado, la cual asume que están en equilibrio H-W y está condicionada a las k frecuencias alélicas observadas. Haldane (1954) afirmó que no es necesario contabilizar todos los posibles arreglos genotípicos, sino solo los posibles arreglos de los genotipos heterocigotos. Para k alelos, la probabilidad condicional de un arreglo con la cantidad genotípica $n_{ijkk'}$ de heterocigotos (para $k < k'$), está condicionado a las cantidades alélicas n_{ijk} observadas, provenientes de k alelos de los locus j muestreados en la población i , y expresada por:

$$\Pr[(n_{ijkk'}) | (n_{ijk})] = \frac{N_i! 2^H \prod_{k=1}^{a_j} (n_{ijk})!}{(2N_i)! \prod_{k \leq k'}^{a_j} (n_{ijkk'})!}$$

donde $H = \sum_k^{a_j} \sum_{k' \neq k}^{a_j} n_{ijkk'}$ es el número de individuos heterocigotos muestreados del locus j en la población i . La hipótesis nula es rechazada cuando la suma de las probabilidades condicionales, ordenadas de forma creciente, es menor al nivel de significancia α establecido.

Guo y Thompson (1992) sugirieron una versión permutada para obtener el valor de p , considerando una población de tamaño N_i en que cada alelo A_{ijk} posee n_{ijk} copias, en un total de $2N_i$ alelos. Se procede a una reestructuración en todos los N_i individuos (genotipos) de la población muestreada, de manera que los pares de alelos son tomados aleatoriamente hasta reconstruirlos nuevamente. El valor de p

(área de rechazo) está por la proporción de arreglos genotípicos (tablas de contingencia) que tuvieran las probabilidades condicionales menores o iguales a la probabilidad condicional del arreglo genotípico original muestreado.

Los aplicativos computacionales tienen establecido variaciones para este proceso de permutación, por ejemplo los métodos MCMC (cadena de Markov e Monte Carlo, del inglés Markov Chain Monte Carlo). En vez de enumerar todos los posibles arreglos genotípicos, se usa el proceso de caminata aleatoria (Cadena de Markov) capaz de explorar eficientemente el espacio de todos los arreglos genotípicos posibles (tablas de contingencia), manteniéndose el número de alelos de la muestra original, o las marginales de la tabla de contingencia original.

b. Prueba de deficiencia y exceso de heterocigotos (Prueba U)

Se centra en la misma hipótesis nula de la prueba de EHW, basada en la unión aleatoria de gametos, y se asemeja a la prueba exacta de Fisher (Haldane, 1954; Guo y Thompson, 1992; Weir, 1996). La diferencia entre ellos radica en una construcción de un área de rechazo. Para evaluar el EHW, la probabilidad condicional de la muestra observada es usada para definir el área de rechazo. El valor de p de la prueba corresponde al sumatorio de las probabilidades de todas las tablas de contingencia, manteniendo la cantidad alélica original, con probabilidad igual o menor que la probabilidad condicional de la población observada. Cuando las hipótesis alternativas son referentes a la deficiencia o exceso de heterocigotos, se sugiere la utilización de una prueba de mayor poder, denominada prueba U (*score test*), conforme Raymond & Rousset (1995), construida a partir de:

$$U = \frac{\delta \text{Log } L_2}{\delta f} \Big|_{f=0, p_{ijk}} = \sum_{k=1}^{aj} \frac{n_{ijkk'}}{\hat{p}_{ijk}} - N_i$$

Donde L_2 es una funcion de máxima verosimilitud, definida por :

$$L_2(f, p_{ijk}; N_i) = \frac{N!}{n_{ij11}! \dots n_{ijkk'}!} [\hat{p}_{ij1}^2 + \hat{f} \hat{p}_{ij1}(1 - \hat{p}_{ij1}^2)]^{n_{ij11}} \cdot [2 \hat{p}_{ij1} \hat{p}_{ij2}(1 - \hat{f})]^{n_{ij12}} \dots [\hat{p}_{ijk}^2 + \hat{f} \hat{p}_{ijk}^2(1 - \hat{p}_{ijk}^2)]^{n_{ijkk'}}$$

Y \hat{f} es el coeficiente de fijación o endogamia dentro de la población considerando la situación de endogamia regular, donde las demás estimativas de $f_{ijkk'}$ son iguales a \hat{f} .

2.3.4 Heterocigosidad

Este parámetro se puede estudiar como heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e). El H_o se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci y se calcula por un cómputo directo, mientras que la H_e , desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Crow y Kimura, 1970). La heterocigosidad esperada es calculada usando una formula a partir de frecuencias alélicas asumiendo el equilibrio Hardy-Weinberg (Nei 1987).

$$H_e = \frac{2N}{2N-1} \left[1 - \sum_{j=1}^1 p_j^2 \right]$$

La heterocigosidad es una medida útil para la informatividad de un locus, es decir los loci con heterocigosidad esperada de 0,5 o menos son en general no muy útiles para el análisis de parentesco. La heterocigosidad promedio de todos los marcadores seleccionados fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\overline{H} = \frac{1}{N} \left[\sum_{i=1}^N H_i \right]$$

Donde H_i es la probabilidad de heterocigosidad en el marcador i th calculado a partir de la ecuación de Nei (1987) y N es el total del número de marcadores usados.

2.3.5 Índices de Fijación

El índice, también conocido como estadístico F de Wright (1965) es la correlación existente en la unión de los gametos al azar en relación a la subpoblación, cuyos valores explican las variaciones de la heterocigosidad debido a apareamientos no aleatorios en la subpoblación y a posibles efectos selectivos.

El cálculo del estadístico F_{st} (coeficiente de diferenciación genética) permite determinar las diferencias genéticas entre localidades, donde los valores de F_{st} igual a 0 indican que no hay diferenciación genética entre estas, mientras que valores significativamente diferentes a cero son un indicativo de estructuración genética de la población.

El valor de F_{is} (coeficiente de endogamia) mide el déficit de heterocigotos presentes al interior de una población. La endogamia implica la reproducción entre individuos emparentados por ancestría (Frankham *et al.*, 2002). Es decir es la probabilidad de que dos alelos homólogos de un individuo sean idénticos por descendencia y se calcula mediante el coeficiente de endogamia (F_{is}), este

parámetro mide las desviaciones que existen entre la heterocigosis observada (H_o) y la esperada (H_e), es decir mide la reducción de la heterocigosis debido al cruzamiento no aleatorio dentro de una subpoblación.

En poblaciones pequeñas, la probabilidad de encontrar dos individuos emparentados aumenta a tal grado que la endogamia es inevitable. De hecho, los coeficientes de endogamia se incrementan con el tiempo en función al tamaño efectivo poblacional. Los valores de F_{IS} pueden variar de -1 y +1, los valores negativos indican un exceso de heterocigotos (no endogamia) y valores positivos un déficit (endogamia), viene dada por el valor absoluto del índice, siendo bajo si el valor está entre 0 y 0.05, medio si se encuentra entre 0.06 y 0.15, alto si se encuentra entre 0.16 y 0.25 y muy alto si es mayor a 0.25 (Hartl, 1988).

$$F_{IS} = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Donde: H_e = heterocigosis esperada media y H_o = heterocigosis observada media.

2.4. Parámetros forenses y de paternidad

Los marcadores utilizados en los diversos estudios deben ser evaluados bajo ciertos parámetros, como el contenido de información polimórfica (PIC), la probabilidad de discriminación, probabilidad de coincidencia, índice de paternidad y la probabilidad de exclusión (PE).

El PIC es un índice que evalúa la informatividad de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos (Botstein y col., 1980; Hearne *et al.* 1992). El valor oscila entre 0 y 1, y se dice que un marcador es altamente informativo cuando el $PIC > 0,5$ razonablemente informativo si se tiene $0,5 > PIC >$

0,25, y poco informativo si ocurre $PIC < 0.25$. Para estos estudios se busca que el marcador tenga muchos alelos y PIC cercanos a 1.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^j p_i^2 - 2 \sum_{i=j \neq 1}^j \sum_{j=1}^{i=1} p_i^2 p_j^2$$

Donde P_i y P_j son las frecuencias de los alelos i th y j th en el locus (Botstein *et al.*, 1980). El promedio de PIC es hallado como el promedio aritmético de los valores del PIC en cada locus.

El Poder de Discriminación (PD) (Jones, 1972; Smalldon y Moffat, 1973) es la probabilidad de que dos individuos no relacionados y tomados al azar puedan ser diferenciados genéticamente mediante el análisis de un marcador o conjunto de marcadores. Esta es una probabilidad complementaria de la probabilidad de coincidencia o de *match* y se calcula de la siguiente manera:

$$PD = 1 - \sum_{i=a}^n p_i^2$$

Siendo p_i la frecuencia del genotipo i

En cuanto a la Probabilidad de Exclusión (PE), se presentan tres situaciones familiares donde cada una de ellas posee una fórmula general. Además, cada fórmula general es transformada y expresada en probabilidades de las frecuencias alélicas (p_i).

a. Caso 1: Cuando se conocen los genotipos del padre, madre y cría.

La fórmula de exclusión general para “n” alelos, se considera cuando se dispone de los genotipos del padre, madre y cría (Jamieson y Taylor, 1997). Entonces el poder de exclusión cuando se conoce a un padre es:

$$P = \sum_{i=1}^n p_i(1 - p_i)^2 - \sum_{1 \leq j=1}^n (p_i p_j)^2 [4 - 3(p_i + p_j)]$$

La cual al ser expresada en probabilidades alélicas (p_i), llega a ser:

$$P = 1 - 2 \sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i=1}^n p_i^2 + 2 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 3 \sum_{i=1}^n p_i^2 \sum_{i=1}^n p_i^3$$

b. Caso 2: Uno de los genotipos (paternal o maternal) no está disponible.

Los registros de pedigrís normalmente tienen información de ambos padres y de la cría; sin embargo ocasionalmente no se dispone de uno de los genotipos de los padres para los análisis por lo que Garber y Morris (1983) propusieron una fórmula general:

$$P = \sum_{i=1}^n p_i^2 (1 - p_j)^2 + \sum_{i \geq j=1}^n 2p_i p_j (1 - p_j - p_j)^2$$

Y es expresada solo en términos de p_i :

$$P = 1 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^2 + 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 4 \sum_{i=1}^n p_i^3 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^4$$

Caso 3: Cuando ambos genotipos de los padres no están disponibles

$$P = 1 + \sum_{i=1}^n [p_i^2 (2 - p_i)]^2 - 2 \left[\sum_{i=1}^n [p_i^2 (2 - p_i)]^2 + 4 \left(\sum_{i=1}^n p_i^3 \right)^2 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^6 \right]$$

(Gundel & Reetz 1981)

La cual, expresada en poderes de p_i , llega a ser:

$$P = 1 + 4 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^6 - 8 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 8 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) \left(\sum_{i=1}^n p_i^3 \right) + 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^3 \right)^2$$

(Jamieson y Taylor 1997)

La Probabilidad de Exclusión Combinada de k marcadores no ligados en cualquiera de las formulas antes mencionadas es:

$$P=1-(1-p_1) (1-p_2) (1-p_3)..... (1-p_k)$$

$$p = 1 - \prod_{i=1}^k p_i$$

2.5 Estudios genético poblacionales de camélidos sudamericanos domésticos.

Diversos autores utilizaron marcadores mitocondriales para aclarar el origen y las relaciones filogenéticas entre las especies domésticas y silvestres de camélidos sudamericanos (Marín *et al.*, 2007). El origen de los camélidos utilizando ADN mitocondrial fueron analizados por Stanley *et al.* (1994), quienes informaron de la presencia de dos grandes grupos: vicugna y guanacos, siendo estos posibles antecesores de la alpaca y llama respectivamente. Kadwell *et al.* (2001) informaron sobre una similitud de haplotipos mitocondriales y microsatélites entre llamas y guanacos, así como similitud de alpacas a las vicuñas. Además detallaron que las frecuencias alélicas de las especies domésticas se encuentran distribuidas entre los grupos de los camélidos silvestres, lo que generó la reclasificación de la alpaca como *Vicugna pacos*.

Se han diseñado aproximadamente 150 microsatélites para alpacas, siendo la mayoría de ellos di-tri nucleótidos utilizados en estudios de diversidad y estructura poblacional (Vidal-Rioja *et al.*, 1994, Lang *et al.* 1996, McPartlan *et al.*, 1998 , Obreque *et al.*, 1998, 1999; Penedo *et al.*, 1998, 1999, Sarno *et al.*, 2000;). Por otro lado, Reed y Chaves (2008) describieron 1516 loci putativos para el estudio

genético poblacional de alpacas; mientras que Munyard (2009) reportó la baja incidencia de microsatélites tetranucleótidos.

Bustamante *et al.* (2002) utilizaron microsatélites derivados de *Lama glama* en una población de 25 llamas y dos poblaciones de guanacos (de 29 y 17 animales) de Argentina para mostrar la existencia de alelos únicos en ambas especies. Posteriormente, los mismos autores en el 2006, analizaron la diversidad genética en tres poblaciones de llamas del noreste argentino, encontrando altos niveles de diversidad alélica y heterocigosis, además de la presencia de alelos únicos. Maté *et al.*, (2005) determinaron una baja diferenciación genética entre dos poblaciones de guanacos criados en semicautiverio utilizando 14 microsatélites. Sarno *et al.*, (2001) determinaron una mayor diversidad genética en los guanacos continentales y respecto a los insulares, posteriormente Sarno *et al.* (2004) revelaron heterocigosis reducida en poblaciones de vicuñas de Bolivia y de Chile. Un trabajo similar realizado en especies domésticas por Barreta *et al.* (2012) en una población de Bolivia, mostró una alta diversidad genética en una población de 149 alpacas de 8 diferentes regiones, encontrando 258 alelos con 22 microsatélites. Los mismos autores encontraron para 12 poblaciones de llamas, una estructura genética débil con intenso flujo genético, sin embargo encontraron que existen poblaciones diferentes genéticamente, probablemente producto de un aislamiento geográfico.

Se han realizado estudios en el Perú de diversidad genética (La Manna *et al.*, 2011) mediante el uso de microsatélites para evaluar las distancias genéticas entre huacayas y suri del Centro Investigación Quimsachata. Los resultados mostraron que no existe divergencia genética entre estos grupos, además

encontraron similares parámetros genéticos en relación a las frecuencias alélicas y variabilidad genética, con valores altos de heterocigosidad y riqueza alélica.

Otro trabajo que analizó la variación genética y fenotípica en poblaciones peruanas fue realizada por Paredes *et al.* (2013), quienes concluyeron que las cinco poblaciones de alpacas en estudio tienen una alta variabilidad genética y la presencia de algunos marcadores relacionados a diámetro de fibra.

Por otro lado, además de los estudios de diversidad genética, los análisis de paternidad utilizando microsatélites son extensamente usados como una herramienta de apoyo en el mejoramiento genético. Se ha descrito que con un total de 10 microsatélites en alpacas, la probabilidad de exclusión supera al 0,999 (Agapito *et al.*, 2008), e incluso la posibilidad de utilizarlos en casos de tráfico ilegal entre especies domésticas (Marín *et al.*, 2009; Di Rocco *et al.*, 2011).

Bajo este contexto, en el distrito de Carabaya, la Sociedad Peruana de Alpacas Registradas (SPAR) de Macusani y con el apoyo de la Oxfam en el 2006 iniciaron un proyecto de mejoramiento genético orientado al blanqueamiento y finura de la fibra, creando el Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita. En este sentido, la selección realizadas de alpacas huacayas blancas obtenidas de las diferentes comunidades de la Región de Puno, se realizó considerando sus características fenotípicas (finura de fibra) para determinar que individuos participarían en el empadre así como su valor de cría, con el fin de obtener un núcleo reproductor elite. Además, estos procesos de selección requieren del conocimiento de la variabilidad genética poblacional y de la determinación de paternidad en la medida que sirva como apoyo para calcular los índices de selección más precisos.

3. HIPÓTESIS

Los rebaños de reproductores de alpacas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita presentan diferencias en la variabilidad genética y alelos únicos que permiten diferenciar cada rebaño, producto de las diferencias en su manejo reproductivo.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

- Caracterizar la variabilidad genética de alpacas huacaya (*Vicugna pacos*) del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita Puno utilizando marcadores microsatélites STR.

Objetivos Específicos

- Genotipificar las poblaciones de alpacas del rebaño de reproductores del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita.
- Determinar la variabilidad genética existente entre y dentro de los rebaños de reproductores de alpacas.
- Evaluar la robustez del panel de microsatélites para la determinación de filiación.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Colecta del material biológico

Se recolectaron al azar, entre los años 2009-2010, un total de 183 alpacas de raza Huacaya blancas, procedentes del Centro Piloto de Mejoramiento Genético Munay Paqocha (coordenadas: 14° 4' 40" LS y 70° 21' 00" LO) ubicado a 4633 msnm del distrito de Macusani, y del Fundo Itita ubicado a 4585 msnm (14° 11' 18" LS y 70° 17' 24" LO) del distrito de Ajoyani. Ambos Centros pilotos pertenecen a la Sociedad Peruana de Alpacas Registradas (SPAR) del departamento de Puno (Tabla 2, Figura 4).

Tabla 2. Población de alpacas huacaya analizadas procedentes de la provincia de Carabaya, departamento de Puno, Perú

Rebaños	Distrito	♂	♀	Total
MUNAY PAQOCHA	Macusani	24	76	100
FUNDO ITITA	Ajoyani	11	72	83
Total		35	148	183

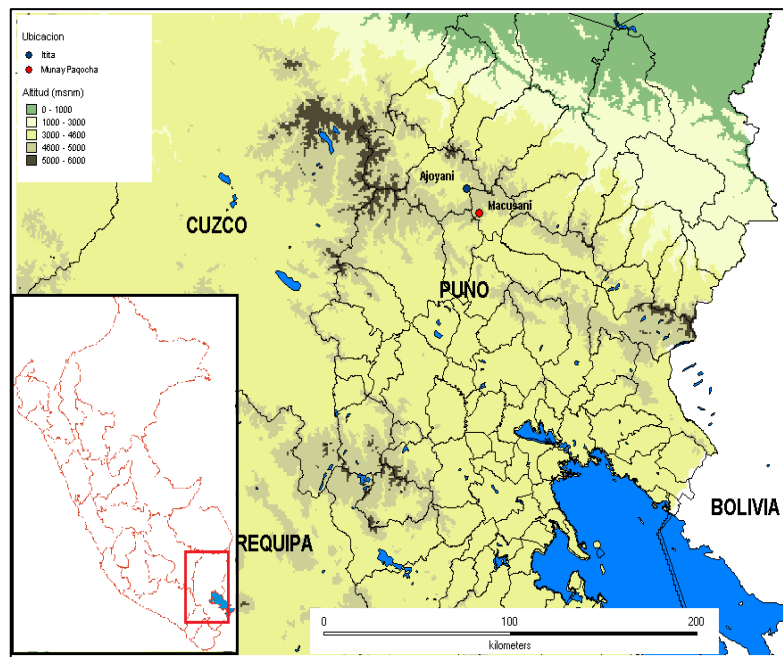


Figura 4. Mapa de la ubicación geográfica de los centros de reproducción de alpacas. (Creado con el programa DIVA-GIS; Fuente: Hijmans *et al.*, 2004)

De cada individuo, se tomó muestras de sangre y de folículos pilosos. Las muestras de pelo se colectaron tomando un mechón de la base de la cola de la alpaca, tirando fuertemente con el dedo pulgar, índice y medio y fueron almacenadas en tubos de 1.5 ml y sus réplicas mantenidas en bolsas plásticas cerradas herméticamente; se consideró este tejido por ser de fácil colecta, almacenamiento y transporte. Por otro lado, las muestras de sangre fueron obtenidas mediante punción a nivel de la vena yugular, colectando 7 ml de sangre por individuo, y almacenándola en tubos de centrifuga de 15 ml con EDTA 2.5% como solución anticoagulante. Todas las muestras fueron codificadas de acuerdo al número de acceso de colecta.

5.2 Extracción de ADN genómico total

5.2.1. Extracción de ADN a partir de sangre

Se realizaron sucesivos lavados de las muestras colectadas con 500 µl de buffer TE (Tris-EDTA proporción 20:5, pH 8,0) hasta obtener un precipitado de leucocitos. Las extracciones de ADN se realizaron según el método de Sambrook y Russell (1989) modificado por el laboratorio, consistiendo en lo siguiente: Los precipitados de leucocitos fueron resuspendidos en buffer TE (Tris-EDTA, proporción 20:5, pH 8,0), con 75 µl de SDS 10%, y 1µl de Proteinasa K (20mg/µl), incubando las muestras a 56 °C por 3 h. Luego se separaron las impurezas agregando 200 µl de acetato de potasio 3 M. El ADN se precipitó con una solución de isopropanol y etanol absoluto, y se resuspendió en buffer TE20;5 (Tris-EDTA, pH 8,0). Se realizaron lavados con soluciones de cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1; luego se lavó con acetato de potasio 3 M y cloruro de sodio 5 M para precipitar las impurezas presentes en el ADN. Finalmente, se agregó etanol absoluto para precipitar el ADN, y se resuspendió en 50-200 ul de buffer TE (TrisEDTA proporción 10:1, pH: 8.0) dependiendo del tamaño del precipitado obtenido. Las extracciones se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

5.2.1. Extracción de ADN a partir de folículos pilosos

Mediante observación bajo un estereoscopio, se seleccionaron aproximadamente 50 pelos de cada individuo para verificar la presencia de folículos pilosos. Se cortaron 2 mm del pelo utilizando tijeras estériles y con la ayuda de pinzas estériles se colocaron en tubos de 2,0 ml conteniendo una solución de lisis (proteinasas K 20 mg/ml, buffer TE proporción 20:5 y SDS 10%) y 50 ul de DTT

(Figura 5). Se realizó el procedimiento descrito anteriormente, considerando una incubación de 3 a 4 horas.



Figura 5. Procedimiento de colecta de muestras de alpacas huacayas blancas. (A) muestras biológicas (B) obtención de sangre (C) obtención de pelo, (D, E) extracción de ADN para el análisis de microsatélites

5.3 Evaluación de las extracciones de ADN.

Para verificar la calidad del ADN, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1%, con *buffer* TBE 1X (*Tris-HCl*, ácido bórico, EDTA; pH 8,0). Las muestras de ADN se mezclaron con *buffer* de carga Sal B 2X (azul de bromofenol, xilencianol, naranja G, sucrosa), el cual facilita la visualización y sedimentación del ADN. Se cargaron en cámaras electroforéticas horizontales, realizando la corrida a un voltaje constante de 80 V, durante 30 minutos. Los geles fueron

teñidos con una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml), fotografiados utilizando un Transiluminador UV *Chemi XR*, y las imágenes fueron procesadas mediante el programa Quantity One v. 4.6.3 (*Biorad*). Las concentraciones de ADN se calcularon utilizando este mismo programa, mediante la selección de una banda de ADN y su comparación con dos concentraciones conocidas. Las soluciones stock de ADN molde o *template* se llevaron a una concentración final aproximada de 10 ng/μl, las cuales se almacenaron a -20° C, hasta su procesamiento. Del mismo modo las soluciones stock se almacenaron a -70°C.

5.4. Amplificación de los marcadores microsatélites

Se seleccionaron 10 marcadores genéticos microsatélites fluoromarcados de tipo dinucleótido (Tabla 3), en función a los altos valores PIC (Índice de Contenido Polimórfico) descritos en estudios previos en camélidos (Lang *et al.*, 1996; Penedo *et al.*, 1998; Obreque *et al.*, 1998; Obreque *et al.*, 1999; Jianlin *et al.*, 2000). Las reacciones de amplificación por PCR multiplex y simples se prepararon en un volumen final de 10 μl, considerando las siguientes concentraciones finales (Mullis, 1990): 1X buffer de PCR, MgCl₂ 2,0 mM, dNTP 0,25 mM, cebador 0.1-0,2 μM (dependiendo de la reacción), 0,05 U de Taq Polimerasa, y 2 μl de ADN 25 ng/μl (Anexo 1). La PCR fue llevada a cabo en el termociclador Mastercycler® Pro Eppendorf, utilizando el siguiente programa de temperaturas: una fase de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguida de 25 ciclos con una primera fase de desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación o anillamiento del iniciador a 62 °C y 58 °C (dependiendo de los iniciadores) por 90 s y una de fase extensión a 72 °C por 1 min; y una extensión final a 60 °C por 30 min (Tabla 4). La estandarización se realizó mediante modificaciones de las concentraciones de MgCl₂, las

temperaturas de hibridización y agrupando a los microsatélites de acuerdo al tamaño del producto; los loci fueron agrupados en sistemas multiplex, dúplex y simple.

Tabla 3. Secuencias de los iniciadores seleccionados para la amplificación de microsatélites en alpacas *Vicugna pacos*.

Iniciadores		Secuencias 5'-3' forward (F) y reverse (R)	Fluoróforo	Referencia
YWLL08	F	ATCAAGTTGAGGTGCTTTCC	5'HEX	Lang <i>et al.</i> , 1996
	R	CCATGGCATTGTGTTGAAGAC		
YWLL44	F	CTCAACAATGCTAGACCTTGG	5'FAM	Lang <i>et al.</i> , 1996
	R	GAGAACACAGGCTGGTGAATA		
LCA05	F	GTGGTTTTTGCCCAAGCTC	5'FAM	Penedo <i>et al.</i> , 1998
	R	ACCTCCAGTCTGGGGATTTC		
LCA08	F	GCTGAACCACAATGCAAAGA	5'HEX	Penedo <i>et al.</i> , 1998
	R	AATGCAGATGTGCCTCAGTT		
LCA37	F	AAACCTAATTACCTCCCCCA	5'NED	Penedo <i>et al.</i> , 1998
	R	CCATGTAGTTGCAGGACACG		
LCA66	F	GTGCAGCGTCCAAATAGTCA	5'FAM	Penedo <i>et al.</i> , 1998
	R	CCAGCATCGTCCAGTATTCA		
YWLL36	F	AGTCTTGGTGTGGTGGTAGAA	5'HEX	Lang <i>et al.</i> , 1996
	R	TGCCAGGATACTGACATTCAT		
LCA94	F	GTCCATTCATCCAGCACAGG	5'NED	Penedo <i>et al.</i> 1999
	R	ACATTTGGCAATCTCTGGAGAA		
VOLP92	F	AGTTATCTTACTTCCAATTTAAAT	5'HEX	Obreque <i>et al.</i> , 1999
	R	AACATAGAAACAGCATTGAG		
LCA90	F	TATAACCCTGGTCTCGCCAA	5'NED	Penedo <i>et al.</i> 1999
	R	CCAAGTAGTATTCCATTATGCG		

Los productos de PCR fueron separados en un analizador genético ABI 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mediante electroforesis capilar, utilizando un gel polímero POP 7 (*Performance Optimised Polymer*). Cada 1,5 µl de producto de PCR fueron mezclados con 9,8 µl de formamida Hi-Di y 0,20 µl de un marcador estándar interno de 500bp GeneScan ROX™. Luego las muestras se sometieron en 94 °C durante 3 min para denaturación e inmediatamente se

produjo un choque térmico colocándolo 3 min en hielo antes de realizar la corrida en el analizador genético.

Tabla 4. Condiciones de amplificación de sistemas multiplex y simples utilizadas para el análisis de microsatélites en alpacas *Vicugna pacos*.

PCR	Iniciadores	Ta (°C)	Rango de tamaño de amplificación (pb)
1	YWLL08	58	82-126
	YWLL44		125-187
	LCA05		182-206
	LCA08		228-250
2	LCA37	62	128-166
	LCA66		217-255
	YWLL36		145-175
	LCA94		187-203
3	VOLP92	58	191-213
4	LCA90	62	229-263

Ta= Temperatura de anillamiento, 1 y 2 sistemas multiplex, 3 y 4 sistema simples

5.5. Análisis de datos

Los fragmentos fueron analizados con el programa GENEMAPPER v. 4.1 Applied Biosystems (Foster City, CA), a fin de poder asignar los alelos a los fragmentos identificados. El software visualiza los fragmentos en forma de picos y se miden en URF (unidades de fluorescencia). Se formó una base de datos con los genotipos de cada una de las muestras, y dichos datos fueron exportados a una hoja de cálculo para los análisis estadísticos. Los alelos fueron denominados de acuerdo a su tamaño molecular, en pares de bases (pb).

Para el análisis de la variabilidad genética se estimó el número efectivo de alelos (Ae) según Frankham *et al.* (2002), el número de alelos y las frecuencias alélicas. La distribución de las frecuencias alélicas de cada locus en cada rebaño reproductor fueron graficadas en histogramas. La evaluación del equilibrio de

Hardy-Weinberg (EHW) para los 10 marcadores microsatélites se realizó según la prueba exacta de Fisher utilizando el método de cadena de Monte Carlo Markov (Guo y Thompson, 1992), así como el déficit y exceso de heterocigotos, además del desequilibrio de ligamiento con el programa GENEPOP v. 4.1 (Rousset, 2008). La corrección secuencial de Bonferroni se aplicó para obtener el valor crítico para múltiples pruebas sobre los 10 loci por población. Los índices de Fijación (F_{IS} , F_{ST} , F_{IT}) fueron calculados usando el programa FSTAT versión 2.9.3.2 (Goudet, 1995). El contenido de índice Polimórfico (PIC), las heterocigosidades observada (H_o) y esperada (H_s) para cada uno de los loci y las heterocigosidades totales fueron determinadas con el programa CERVUS v. 3.0 (Kalinowski, et al., 2007). El poder de discriminación (PD), fue calculado con el programa Power Stat v. 12; la probabilidad de exclusión (PE) de los marcadores STR se determinó con el programa CERVUS v. 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007) bajo tres supuestos: primero es la probabilidad de exclusión cuando uno de los genotipos (paternal o maternal) no está disponible (PE-1), segundo cuando se conoce los genotipos del padre, madre y cría (PE-2), y por último cuando se tiene un par de padres candidatos (PE-PP).

Se realizó un análisis de identidad, para encontrar coincidencias o duplicidad de genotipos. La simulación de paternidad tiene dos propósitos, evaluar el poder de resolución de los marcadores y estimar el valor crítico del LOD (logaritmo natural de verosimilitud –*odd ratio*) para determinar el nivel de confianza. Además, se realizó una simulación para determinar el grado de confianza de los marcadores microsatélites, considerando 10000 ciclos para 75 padres candidatos y un error de tipificación de 0,01.

Para realizar la designación de paternidad fueron determinadas las frecuencias alélicas y las simulaciones de paternidad/maternidad con dos intervalos de confianza de 80% y 95%, las cuales corresponden a condiciones relajadas y estrictas, respectivamente. Se calcularon los LOD para cada uno de los machos adultos; según Marshall *et al.* (1998) el LOD score para un posible padre es igual a:

$$LOD = \ln \left[\frac{L(H_1)}{L(H_2)} \right];$$

Donde H_1 es la hipótesis que el supuesto padre es verdaderamente el padre de la cría, y H_2 es la hipótesis que el supuesto padre no está relacionado a la madre y cría.

Los resultados se evaluaron de acuerdo a los valores de delta (Δ) y el LOD. El valor delta es la diferencia de los valores de LOD de los padres más probables; un valor positivo implica que el padre designado es el más probable, y un valor negativo ocurre cuando el padre en cuestión no es compatible. Para el análisis se formaron dos grupos de crías: 39 familias de Munay Paqocha y 23 familias del Fundo Itita, utilizando como base los registros genealógicos proporcionados por el SPAR-Macusani.

6. RESULTADOS

6.1 Extracciones de ADN a partir de sangre y folículo piloso

El protocolo de Sambrook (1989) modificado en el laboratorio permitió aislar ADN genómico de buena calidad tanto en muestras de pelo como de sangre, sin presentar signos de degradación o fragmentación (Fig. 6). Se obtuvieron mayores concentraciones de ADN en muestras de sangre que en pelo, realizando diluciones con buffer TE 10:1. Las muestras con menores concentraciones amplificaron con efectividad (Anexo 2).

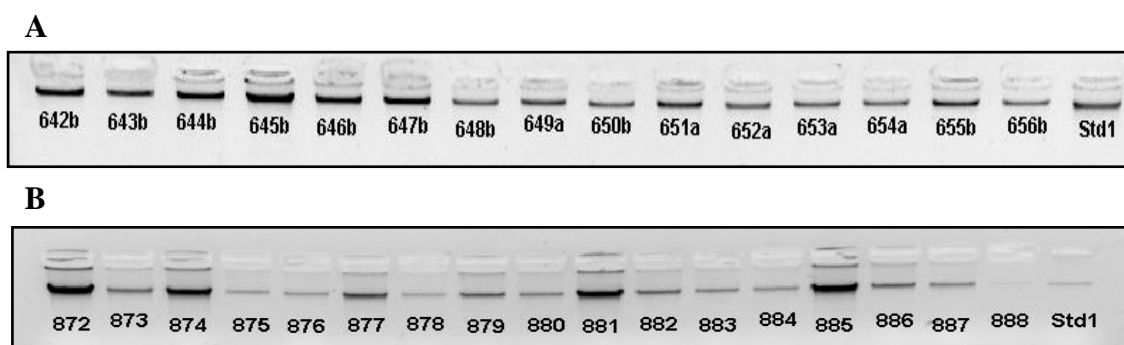


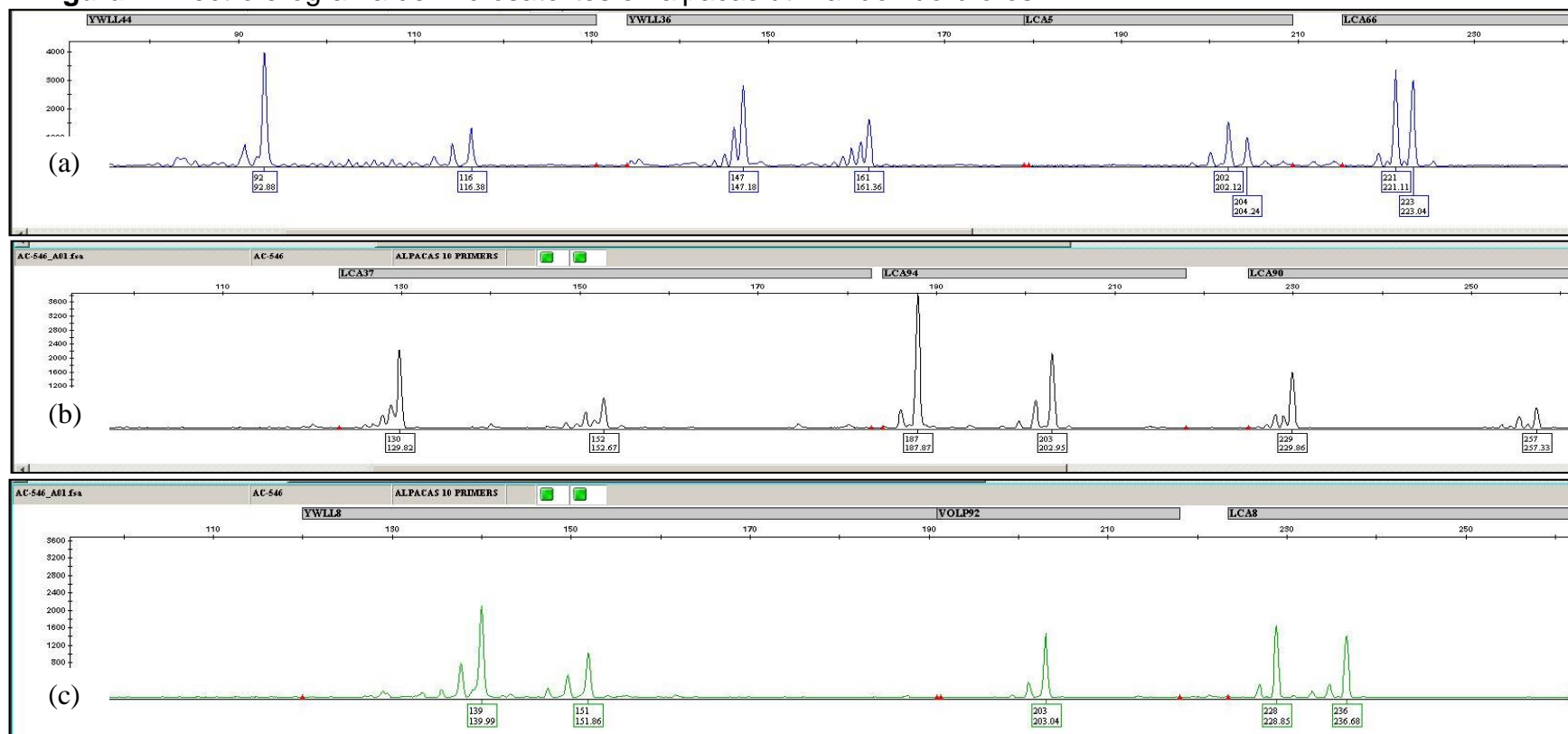
Figura 6. Gel de agarosa (1%) de las extracciones de ADN genómico total a partir de sangre (A) y de folículos pilosos (B) de alpacas huacayas blancas *Vicugna pacos*. Std1 = control estándar de 20 ng/μl.

6.2. Parámetros indicativos de variabilidad genética

6.2.1 Identificación de alelos

El número total de alelos (A) identificados a través de los 10 marcadores STR (Fig. 7) fue de 134. El mayor número de alelos (n=26) se encontró en el locus YWLL 08 representando el 19,40% del total; mientras el menor número (n=8) para el locus LCA8 (5,97% del total) (Tabla 5). Los individuos del Centro Munay Paqocha presentaron un promedio de 13,1 alelos, mientras que de Itita un promedio de 12,4 alelos, ambas zonas con similares valores de desviaciones estándar. Los alelos efectivos promedio calculados fueron de 7,38.

Figura 7. Electroferograma de microsatélites en alpacas utilizando fluoróforos.



(a) 5-FAM, (b) HEX, (c) NED.

Tabla 5. Número total de alelos por rebaño de alpacas del Centro Munay Paqocha (MP) y del Fundo Itita

Loci identificados	Rebaño Reproductor		A	Ae
	MP	ITITA		
LCA37	17	15	18	7.19
LCA5	10	9	10	4.61
LCA66	13	13	13	6.09
LCA8	9	9	9	6.66
LCA90	12	11	12	5.97
LCA94	8	8	8	5.57
VOLP92	11	12	12	5.36
YWLL36	13	12	13	7.12
YWLL44	13	10	13	7.63
YWLL8	25	25	26	17.54
Promedio+D.S	13.1± 4.88	12.40±4.904	13.4	7.38

(D.S. = desviación estándar; A= número total de alelos; Ae= número de alelos efectivos).

Parte de los resultados de la presente tesis se presentó en el VI Congreso Mundial de Camélidos el poster titulado: ANÁLISIS GENÉTICO POBLACIONAL DE ALPACAS HUACAYA (VICUGNA PACOS) DE LA REGIÓN PUNO UTILIZANDO SSR, realizado el 21- 23 de Noviembre del 2012 en Arica Chile (Yalta *et al.*, 2012).

6.2.2 Frecuencias alélicas

a. Locus LCA37:

De los 18 alelos registrados en este locus, solo 15 pertenecieron al Fundo Itita, encontrándose ausentes los alelos 128, 148, 154. El alelo 130 fue el de mayor frecuencia en ambos rebaños (26%), siendo los alelos con mayor repetición los menos frecuentes. El alelo 166 no se observó en individuos del centro Munay Paqocha.

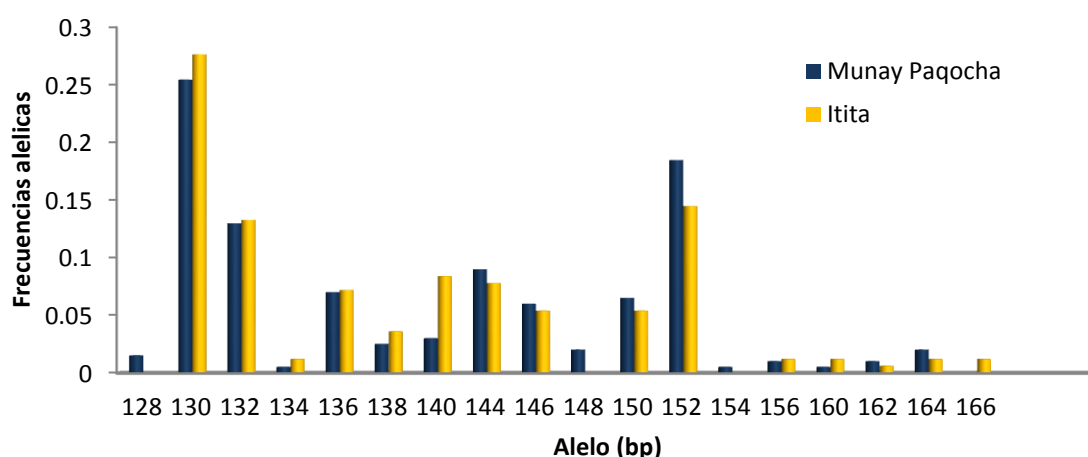


Figura 8. Distribución de las frecuencias alélicas del locus LCA37 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita.

b. Locus LCA05:

Se observaron un total de 10 alelos; los de frecuencia mayor a 20% fueron los alelos 188, 202, 204; siendo el 202 el más frecuente (30%) en ambos rebaños y el 190 el menos frecuente (1,5%, 0,6%). No se encontró el alelo 200 en el Fundo Itita.

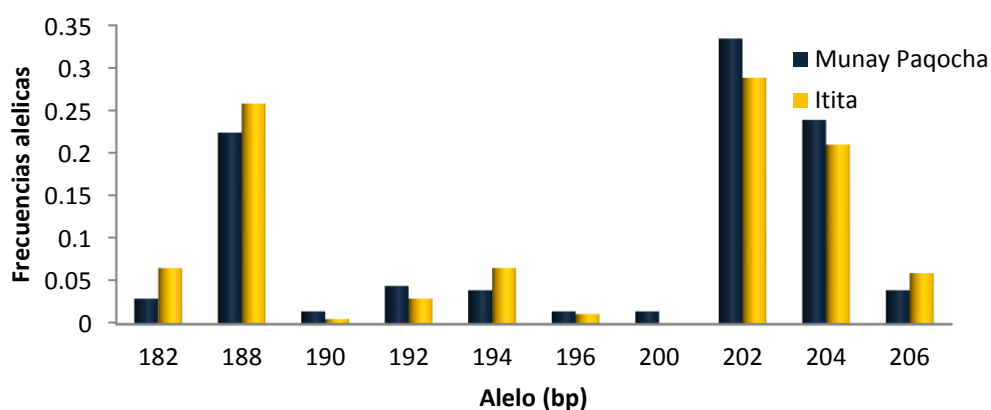


Figura 9. Distribución de las frecuencias alélicas del locus LCA 05 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita

c. Locus LCA66:

El alelo con mayor frecuencia en ambos rebaños fue el 223 (31%), el de menor frecuencia en el Centro Munay Paqocha fue 241 (1,5%) y mientras que en el fundo Itita fue el alelo 251 (0,6%). No se registraron alelos exclusivos. Además, se observó una diferencia en la frecuencia del alelo 233 entre el Fundo Itita (14,5%) y el Centro Munay Paqocha (4,0%), presentando un comportamiento similar los alelos 227 y 239.

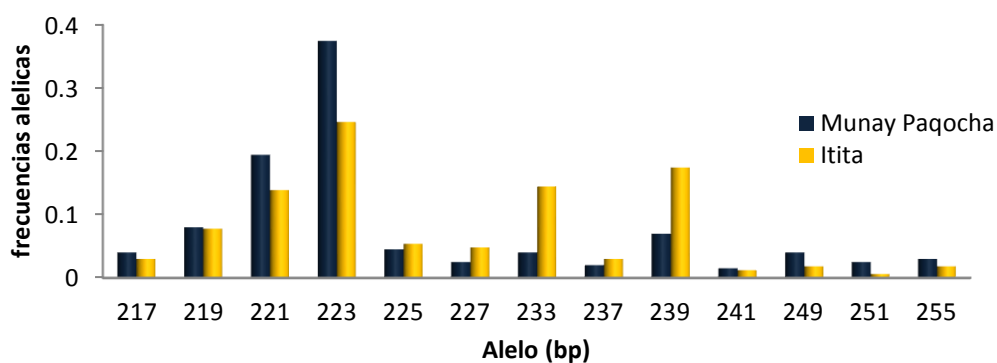


Figura 10. Distribución de las frecuencias alélicas del locus LCA66 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita

d. Locus LCA08:

Presentó frecuencias alélicas similares en ambos rebaños, siendo el alelo 228 de mayor frecuencia (24,8%) y menor el alelo 248 (2,1%). Se observó que los alelos con mayor repetición fueron los menos frecuentes; no se registró ningún alelo exclusivo.

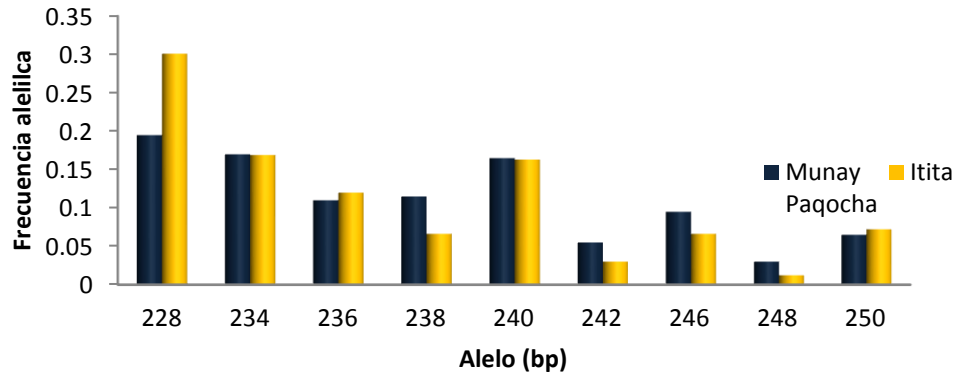


Figura 11. Distribución de las frecuencias alélicas del locus LCA08 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita

e. Locus LCA90:

Los alelos más frecuentes en ambos rebaños fueron el 231 y 251; el alelo menos frecuente en el Centro MP fue el 263 (0,5%), y en el Fundo Itita los alelos 235 (0,6%) y 253 (0,6%). Además se observó que el alelo 263 no estuvo presente en el Fundo Itita.

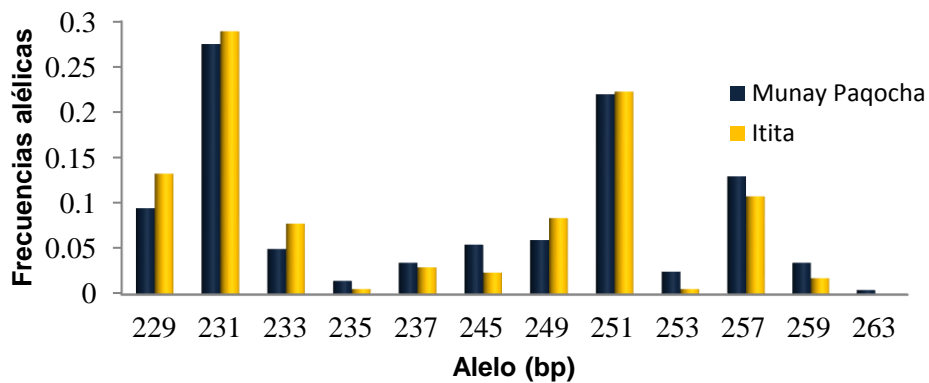


Figura 12. Distribución de las frecuencias alélicas del locus LCA 90 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita.

f. Locus LCA94:

Los alelos con mayor frecuencia (>18%) fueron 187,191, 199 ,203; y el menos frecuente el alelo195. En el Fundo Itita, el alelo con mayor frecuencia fue 191 (25,3%) y el de menor frecuencia el alelo 195 (1,2%). Los alelos con mayor repetición fueron los de mayor frecuencia.

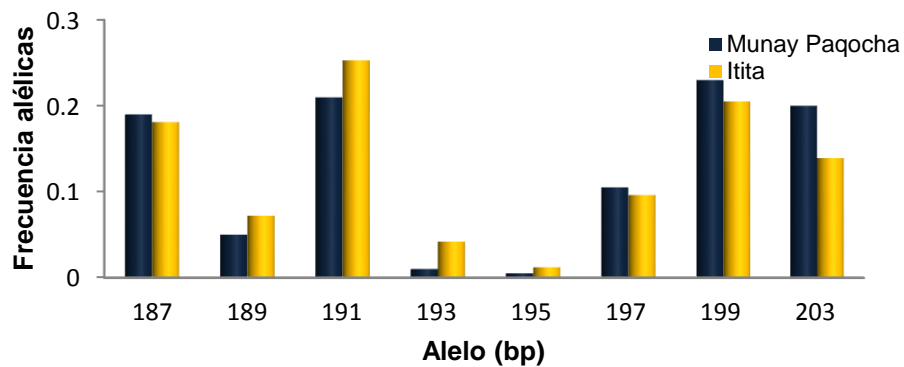


Figura 13. Distribución de las frecuencias alélicas del locus LCA94 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita

g. Locus VOLP92:

Las frecuencias alélicas fueron similares en ambos rebaños siendo el alelo con mayor frecuencia el 203 (38%) y el menos frecuente 195 (1.5%), por otro lado, el alelo 209 (0.6%) fue el menos frecuente en el Fundo Itita no registrándose en Munay Paqocha.

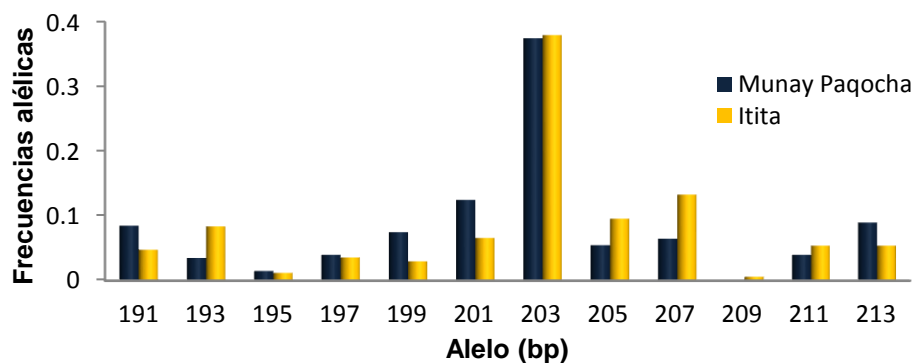


Figura 14. Distribución de las frecuencias alélicas del locus VOLP92 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita

h. Locus YWLL36:

En ambos rebaños el alelo más común fue el 161 y el alelo con menor frecuencia fue el 167 (1,0%). El alelo 157 fue el menos frecuente (0,5%) en el Centro Munay Paqocha, y no se registró en el Fundo Itita .

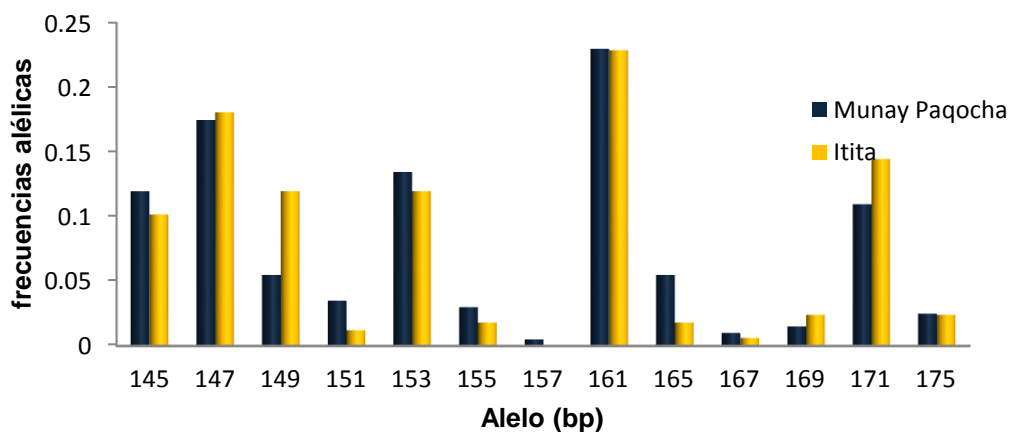


Figura 15. Distribución de las frecuencias alélicas del locus YWLL36 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita

i. Locus YWLL44:

Las frecuencias alélicas son similares en ambos rebaños, el Fundo Itita presentó 10 alelos, siendo los 90, 114 y 124 exclusivos para el Centro Munay Paqocha. Los alelos con mayor frecuencia fueron el 94 (19%) y el 118 (20%) ubicados en ambos extremos de la distribución. El alelo 102 (12%) fue el más frecuente en el Fundo Itita comparado con Munay Paqocha (4%).

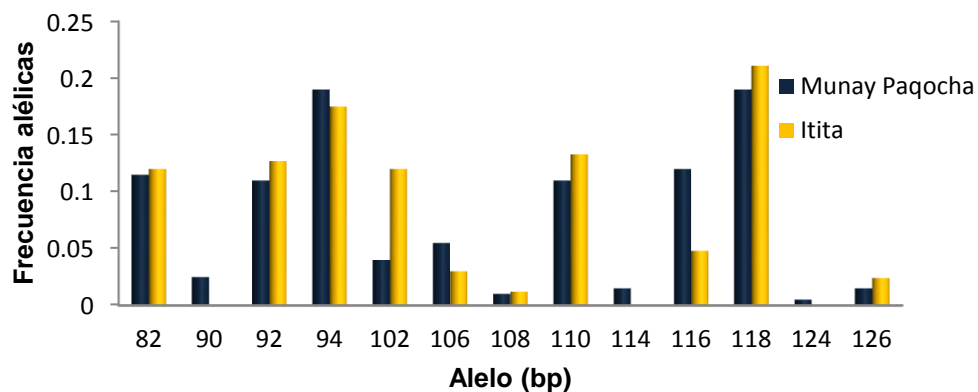


Figura 16. Distribución de las frecuencias alélicas del locus YWLL44 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita

j. Locus YWLL08:

En general no se evidenciaron frecuencias altas de alelos, como en el caso de los marcadores descritos anteriormente, estas frecuencias no superaron el 13.3% como lo observado en el alelo 139 del Fundo Itita y el 133 en el Centro Munay Paqocha. El alelo 141 solo se encontró en el Fundo Itita, y el alelo 131 sólo en el Centro Munay Paqocha.

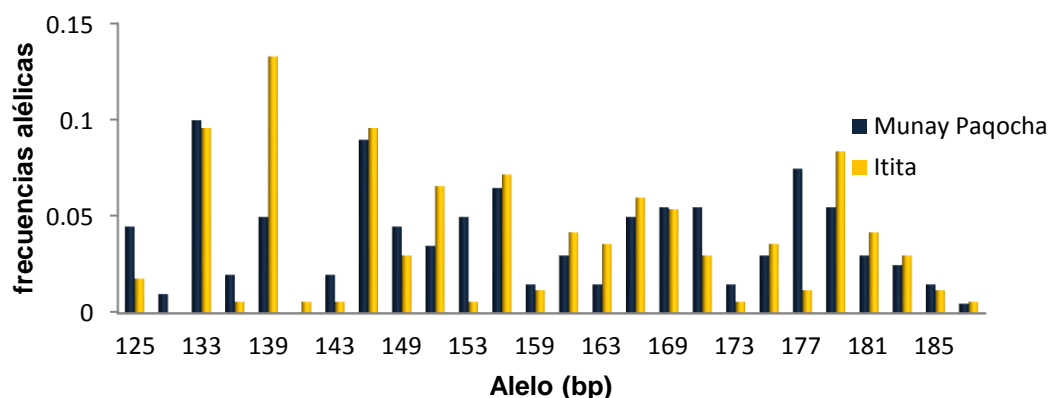


Figura 17. Distribución de las frecuencias alélicas del locus YWLL08 de alpacas huacayas blancas del Centro Munay Paqocha y el Fundo Itita

6.2.3 Equilibrio Hardy Weinberg (EHW) y desequilibrio de ligamiento

Considerando 900 combinaciones y la corrección de Bonferroni ($p < 0.00111$), no se encontraron valores significativos de desequilibrio de ligamiento para los pares de marcadores analizados.

La prueba global para los dos rebaños y los 10 loci analizados mostró que, los loci LCA8 y VOLP 92 se encontraron en EHW después de aplicar la corrección de Bonferroni ($p < 0,005$; Rice, 1989) obteniéndose valores de $p = 0.0359$ y $p = 0,0267$, respectivamente. Cuando se realizó el análisis por rebaño reproductor, en el Centro Munay Paqocha se observó una desviación del EHW para los loci LCA8 y VOLP92, y en el Fundo Itita se obtuvo desviación del loci YWLL36 (bajo la hipótesis alterna exceso de heterocigotos). Después de aplicar la corrección de Bonferroni en ambos análisis, solo el loci LCA8 mostró una ligera desviación de EHW (Tabla N° 6)

Tabla 6. Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) evaluado mediante la prueba exacta para cada locus en las poblaciones de alpacas del Centro Munay Paqocha, Itita y total. Bajo la hipótesis alterna (H1: Existe déficit de heterocigotos y exceso de heterocigotos).

STR	Munay Paqocha				Itita				Total			
	Exceso de Heterocigotos		Déficit de Heterocigotos		Exceso de Heterocigotos		Déficit de Heterocigotos		Exceso de Heterocigotos		Déficit de Heterocigotos	
	P-val*	S.E.	P-val*	S.E.	P-val*	S.E.	P-val*	S.E.	P-val*	S.E.	P-val*	S.E.
LCA37	0,2938	0,0538	0,7307	0,0453	0,2150	0,0353	0,7597	0,0356	0,1746	0,0430	0,8249	0,0329
LCA5	0,8691	0,0167	0,1082	0,0156	0,8278	0,0161	0,2143	0,0182	0,9253	0,0108	0,0617	0,0102
LCA66	0,2377	0,0351	0,7566	0,0297	0,7067	0,0378	0,1948	0,0260	0,3351	0,0411	0,6957	0,0296
LCA8	0,9932	0,0014	0,0049 ^{*1}	0,0012	0,1750	0,0163	0,8194	0,0183	0,9783	0,0037	0,0359 [*]	0,0080
LCA90	0,9691	0,0071	0,0503	0,0100	0,7281	0,0324	0,2498	0,0199	0,9301	0,0128	0,0619	0,0127
LCA94	0,1777	0,0133	0,8372	0,0107	0,6338	0,0237	0,3842	0,0164	0,3674	0,0257	0,6142	0,0204
VOLP92	0,9805	0,0048	0,0217 [*]	0,0063	0,8614	0,0182	0,1332	0,0161	0,9766	0,0064	0,0267 [*]	0,0083
YWLL36	0,5860	0,0406	0,4464	0,0409	0,0337 [*]	0,0096	0,9740	0,0098	0,1378	0,0280	0,8133	0,0256
YWLL44	0,9412	0,0154	0,0584	0,0117	0,4842	0,0250	0,4918	0,0212	0,8782	0,0217	0,1078	0,0216
YWLL08	0,3726	0,0610	0,6080	0,0621	0,0973	0,0375	0,9180	0,0264	0,0984	0,0301	0,8769	0,0359

P-val = valor de significancia, $p < 0.05$. ¹ valores en negrita muestran desviación significativa de EHW después de la aplicación de la corrección de Bonferroni, $p < 0.005$ ($p_1 = 0.05/k = 10$, donde k es el número de loci)

6.2.4 Heterocigosidad (Nei, 1984) y PIC

Los valores de heterocigosidad esperada (H_e) de los marcadores LCA5, LCA8, LCA90, VOLP92, YWLL36, YWLL44 en el Centro Munay Paqocha fueron más altos que la observada (H_o), indicando un déficit de heterocigosidad; el Fundo Itita presentó 4 marcadores (LCA5, LCA90, LCA94, YWLL44) con un H_e mayor a la H_o , mientras que para ambos rebaños el LCA5 presentó el valor más bajo (0.777 y 0.796 respectivamente) y YWLL08 el valor más alto (0,950 y 0,937, respectivamente).

Al analizar a los dos rebaños como uno solo, 6 marcadores presentaron valores de H_e mayores a los observados, indicando nuevamente un déficit de heterocigotos. Todos los marcadores STR mostraron un alto grado de heterocigosidad observada (H_o) con valores superiores a 0,732. Del mismo modo, la heterocigosidad esperada (H_e) para cada loci presentaron valores superiores a 0,785 indicando una elevada diversidad genética. La diferencia del promedio de las heterocigosidades no fue significativa. (Tabla 7).

El valor de PIC, que determina el grado de polimorfismo de un marcador, para este grupo de loci se observó entre 0,752 (LCA05) y 0,94 (YWLL08), con un promedio total de 0,8301. Sin embargo este valor es dependiente del número de alelos y sus frecuencias, por lo que este parámetro no se consideró como un único aspecto para elegir o rechazar un marcador.

Tabla 7. Estimación de heterocigosidad de Nei 1984, PIC, calculadas para las poblaciones de alpacas del Fundo Itita, Centro Munay Paqocha y total.

STR	MUNAY PAQOCHA		ITITA		TOTAL		PIC
	Ho	He	Ho	He	Ho	He	
LCA37	0,870	0,865	0,892	0,864	0,880	0,863	0,848
LCA5	0,700	0,777	0,771	0,796	0,732	0,785	0,752
LCA66	0,800	0,804	0,867	0,860	0,831	0,838	0,820
LCA8	0,810	0,868	0,831	0,830	0,820	0,852	0,833
LCA90	0,760	0,842	0,807	0,827	0,781	0,834	0,813
LCA94	0,850	0,817	0,819	0,831	0,836	0,823	0,796
VOLP92	0,750	0,815	0,843	0,812	0,792	0,816	0,799
YWLL36	0,840	0,867	0,916	0,858	0,874	0,862	0,845
YWLL44	0,820	0,875	0,855	0,864	0,836	0,871	0,855
YWLL08	0,950	0,950	0,976	0,936	0,962	0,946	0,940
Promedio	0,815±0,070	0,848±0,049	0,858±0,059	0,848±0,039	0,8344±0,063	0,849±0,043	0,8301

Ho= heterocigosidad observada, He= heterocigosidad esperada, PIC = Contenido de información polimórfica.

6.2.5 Índices de Fijación

Al analizar por población, el valor absoluto del F_{IS} para ambas poblaciones no fue significativamente diferente de cero. El Fundo Itita presentó un F_{IS} total negativo (-0,012) mostrando 6 loci con exceso de heterocigotos (LCA37, LCA66, LCA8, VOLP92, YWLL36, YWLL08), mientras que por el contrario el Centro Munay Paqocha presentó solo dos marcadores con valores negativos (LCA37, LCA94), con un F_{IS} para el total de 0,039. Para el total de la población, el valor F_{ST} resultó ser muy bajo (0,003), indicando una baja diferenciación genética entre las dos poblaciones; el F_{IS} total mostró que la reducción en la heterocigosidad individual fue de 0.016, lo que indica un apareamiento aleatorio; el valor promedio de F_{IT} que mide la disminución de la heterocigosidad de un individuo en relación a la población total fue de 0,019 (Tabla 8).

Tabla 8. Índice de Fijación (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) calculadas para la población de Total, Fundo Itita y el Centro Munay Paqocha evaluado mediante marcadores STR.

STR		Rebaño		TOTAL
		MUNAY PAQOCHA	ITITA	
<i>Fis por locus por población</i>	LCA37	-0,006	-0,033	-0,019
	LCA5	0,099	0,032	0,067
	LCA66	0,006	-0,009	0,009
	LCA8	0,067	-0,002	0,038
	LCA90	0,098	0,024	0,063
	LCA94	-0,04	0,014	-0,016
	VOLP92	0,08	-0,039	0,029
	YWLL36	0,031	-0,068	-0,014
	YWLL44	0,063	0,01	0,04
	YWLL08	0	-0,043	-0,017
<i>Total por población</i>	F_{IS}	0,039	-0,012	0,016
	F_{IT}			0,019
	F_{ST}			0,003

6.3 Estimación de parámetros forenses y de paternidad

Los estadísticos forenses miden en conjunto la confiabilidad al momento de diferenciar genéticamente a los individuos de una población. Al analizar la probabilidad de discriminación (PD) que permite evaluar la capacidad de los marcadores de discriminar a un individuo tomado al azar, se encontró que el locus con mayor poder de discriminación fue el YWLL08 (98.9%). Igualmente los marcadores restantes presentaron valores superiores al 90%.

Por otro lado los estadísticos de paternidad como las probabilidades de exclusión, fueron calculados suponiendo tres situaciones distintas: 1) el promedio de la probabilidad de exclusión fue de 0,99972; cuando se conoce el genotipo de uno de los padres (PE-1); 2) la probabilidad de exclusión (PE-2) fue de 0,9999966 cuando se conoce los genotipos de ambos padres; y por último 3) cuando se tiene un par de padres candidatos la probabilidad de exclusión (PE-PP) fue 0,99999. (Tabla 9). Además, se observó la probabilidad de exclusión con menor valor para el LCA5 y mayor para el YWLL08, en las tres situaciones. El número de loci mínimo a utilizar para alcanzar una probabilidad mayor a 0,99 fue 5 con los PE-2 más altos (Tabla 9).

Tabla 9. Probabilidades de exclusión combinada para los 10 microsatélites.

STR	PE1	PE-2	PE-PP	PD
LCA37	0,577	0,733	0,897	0,961
LCA5	0,407	0,584	0,77	0,922
LCA66	0,522	0,689	0,868	0,952
LCA8	0,536	0,701	0,869	0,955
LCA90	0,505	0,674	0,852	0,947
LCA94	0,472	0,646	0,822	0,937
VOLP92	0,49	0,664	0,856	0,946
YWLL36	0,562	0,721	0,885	0,960
YWLL44	0,579	0,736	0,895	0,964
YWLL08	0,793	0,885	0,977	0,989
PEC	0,99972	0,9999966	0,99999999957	

(PE-1 = cuando se conoce el genotipo de uno de los padres; PE-2 = cuando se conoce los genotipos de ambos padres la probabilidad de exclusión; PE-PP = cuando se tiene un par de padres candidatos la probabilidad de exclusión)

Tabla 10. Probabilidad de exclusión combinada (PEC) en términos de número de microsatélites usados ordenados de mayor a menor PE

STR	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*
YWLL08	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885	0,885
YWLL44		0,736	0,736	0,736	0,736	0,736	0,736	0,736	0,736	0,736
LCA37			0,729	0,729	0,729	0,729	0,729	0,729	0,729	0,729
YWLL36				0,721	0,721	0,721	0,721	0,721	0,721	0,721
LCA8					0,701	0,701	0,701	0,701	0,701	0,701
LCA66						0,689	0,689	0,689	0,689	0,689
LCA90							0,674	0,674	0,674	0,674
VOLP92								0,664	0,664	0,664
LCA94									0,642	0,642
LCA5										0,584
PEC	0,885	0,96964	0,991772	0,997705	0,999314	0,999787	0,99993	0,999977	0,999992	0,999997

*Numero de Loci

6.4. Asignación y simulación de paternidad /maternidad

Con la información de la genotipificación de los animales muestreados, se realizaron pruebas de maternidad y paternidad usando criterios de restricción al 85% y 95% de confianza. Los resultados del análisis de identidad mostraron que un individuo fue colectado por duplicado.

Se logró el asignamiento de paternidad del 100% de las crías. De las 39 crías en el Centro Munay Paqocha, se encontró un 7,69% de error de maternidad ($LOD = -2,93E+00$ a $-8,45E+00$) y el error de paternidad fue 17,95 % ($LOD = -1,33E+01$ a $-3,48E+00$). Por otro lado, de las 23 crías en el Fundo Itita se encontraron 13.04% asignaciones maternas incorrectas ($LOD = -1,31E+01$ a $-3,77E+01$) y un 30,4% de asignación paterna erróneas ($LOD = -1,31E+01$ a $-2,69E+01$) (Tablas 11 y 12).

Tabla 11. Relación de Asignación de Paternidad en el Centro Munay Paqocha.

N	Crías	Madre	Loci mist ++	LOD score	Padre	Loci mist ++	LOD score	Delta	Conf.
1	AC-999	AC-841	1	5.34E+00	AC-602	0	1.22E+01	1.71E+01	*
2	AC-998	AC-636	3	-3.89E+00	AC-630	2	-3.48E+00	0.00E+00	error
3	AC-997	AC-575	0	6.85E+00	AC-603	4	-1.33E+01	0.00E+00	error
4	AC-996	AC-550	0	6.61E+00	AC-609	0	8.25E+00	1.47E+01	*
5	AC-995	AC-859	0	6.64E+00	AC-614	0	1.18E+01	1.48E+01	*
6	AC-994	AC-853	1	1.32E+01	AC-611	0	9.65E+00	1.17E+01	*
7	AC-993	AC-845	0	1.24E+01	AC-610	1	3.49E+00	6.45E+00	*
8	AC-992	AC-577	0	8.16E+00	AC-602	7	-2.60E+01	0.00E+00	error
9	AC-990	AC-847	2	-2.93E+00	AC-612	0	1.09E+01	3.50E-01	+
10	AC-989	AC-1100	0	1.04E+01	AC-602	6	-1.96E+01	0.00E+00	error
11	AC-987	AC-852	0	1.14E+01	AC-609	1	8.43E+00	1.04E+01	*
12	AC-986	AC-843	0	1.46E+01	AC-625	0	1.11E+01	1.53E+01	*
13	AC-985	AC-849	0	7.57E+00	AC-616	0	1.21E+01	1.57E+01	*
14	AC-984	AC-856	0	8.62E+00	AC-606	4	-1.45E+01	0.00E+00	error
15	AC-983	AC-847	0	7.94E+00	AC-623	6	-2.27E+01	0.00E+00	error
16	AC-1030	AC-581	0	1.42E+01	AC-605	0	8.69E+00	1.28E+01	*
17	AC-1029	AC-587	0	1.33E+01	AC-622	0	9.70E+00	1.32E+01	*
18	AC-1028	AC-599	0	8.12E+00	AC-614	0	8.66E+00	1.49E+01	*
19	AC-1027	AC-860	0	9.52E+00	AC-616	0	1.25E+01	1.81E+01	*
20	AC-1026	AC-560	0	7.57E+00	AC-609	1	5.29E+00	1.10E+01	*
21	AC-1024	AC-583	0	1.08E+01	AC-612	0	8.71E+00	1.39E+01	*
22	AC-1023	AC-588	2	8.15E-02	AC-616	0	1.31E+01	1.62E+01	*
23	AC-1022	AC-593	0	8.82E+00	AC-610	0	9.99E+00	1.35E+01	*
24	AC-1021	AC-858	0	1.05E+01	AC-609	7	-2.69E+01	0.00E+00	error
25	AC-1020	AC-590	0	1.51E+01	AC-603	0	1.13E+01	1.55E+01	*
26	AC-1018	AC-555	0	1.47E+01	AC-624	0	9.05E+00	1.32E+01	*
27	AC-1017	AC-854	0	1.39E+01	AC-606	0	1.46E+01	1.89E+01	*
28	AC-1015	AC-561	0	6.92E+00	AC-614	0	9.72E+00	1.61E+01	*
29	AC-1014	AC-576	0	1.37E+01	AC-613	1	6.44E+00	9.19E+00	*
30	AC-1013	AC-563	1	4.33E+00	AC-611	0	1.10E+01	1.52E+01	*
31	AC-1012	AC-586	0	9.37E+00	AC-604	0	1.19E+01	1.87E+01	*
32	AC-1011	AC-568	0	1.14E+01	AC-623	0	1.22E+01	1.62E+01	*
33	AC-1010	AC-848	0	1.19E+01	AC-623	0	1.01E+01	1.50E+01	*
34	AC-1008	AC-585	0	1.23E+01	AC-616	0	1.29E+01	1.76E+01	*
35	AC-1007	AC-592	1	3.70E+00	AC-612	0	9.53E+00	1.40E+01	*
36	AC-1004	AC-855	0	7.50E+00	AC-615	0	8.45E+00	1.25E+01	*
37	AC-1003	AC-589	1	1.04E+01	AC-604	0	1.02E+01	1.56E+01	*
38	AC-1002	AC-850	0	1.08E+01	AC-622	0	7.83E+00	1.08E+01	*
39	AC-1000	AC-1101	3	-8.45E+00	AC-604	7	-2.83E+01	0.00E+00	error

Valores negativos de LOD indican menor probabilidad de que el asignado padre o madre sean los verdaderos (error). LOD score= likelihood, niveles de confianza= + relajado (al 80%) y * estricto (al 95%), Loci mist = numero de loci que no coinciden entre la cría y el parental.

Tabla 12. Relación de Asignación de Paternidad en el Fundo Itita.

N	Crías	Madre	Loci mist	LOD score	Padre	Loci mist	LOD score	Delta	confidencia
1	AC-1031	AC-648	0	9.76E+00	AC-627	0	1.09E+01	1.67E+01	*
2	AC-1032	AC-873	0	8.61E+00	AC-627	0	8.89E+00	1.33E+01	*
3	AC-1033	AC-656	5	-1.66E+01	AC-633	0	8.52E+00	8.81E+00	*
4	AC-1034	AC-662	0	7.15E+00	AC-630	7	-2.57E+01	0.00E+00	error
5	AC-1035	AC-872	0	1.11E+01	AC-628	0	5.86E+00	1.02E+01	*
6	AC-1036	AC-879	0	1.27E+01	AC-627	0	7.04E+00	1.27E+01	*
7	AC-1037	AC-871	0	9.17E+00	AC-628	0	6.53E+00	1.05E+01	*
8	AC-1038	AC-875	2	-3.77E-01	AC-632	0	5.20E+00	2.99E+00	+
9	AC-1039	AC-659	0	8.21E+00	AC-634	0	1.10E+01	1.57E+01	*
10	AC-1042	AC-653	0	8.30E+00	AC-628	0	5.97E+00	9.92E+00	*
11	AC-1043	AC-678	0	1.13E+01	AC-633	5	-1.71E+01	0.00E+00	error
12	AC-1045	AC-650	0	6.18E+00	AC-625	0	9.76E+00	1.49E+01	*
13	AC-1046	AC-864	0	9.01E+00	AC-629	0	7.60E+00	1.24E+01	*
14	AC-1047	AC-646	0	8.15E+00	AC-626	0	1.40E+01	1.68E+01	*
15	AC-1052	AC-877	0	8.65E+00	AC-631	0	9.68E+00	1.39E+01	*
16	AC-1053	AC-886	4	-1.31E+01	AC-632	0	1.24E+01	2.94E+00	+
17	AC-1056	AC-867	0	9.61E+00	AC-635	4	-1.45E+01	0.00E+00	error
18	AC-1058	AC-641	0	1.29E+01	AC-625	0	1.11E+01	1.70E+01	*
19	AC-1060	AC-869	0	1.18E+01	AC-634	0	9.96E+00	1.13E+01	*
20	AC-1062	AC-663	0	1.26E+01	AC-632	4	-1.31E+01	0.00E+00	error
21	AC-1063	AC-876	1	6.59E+00	AC-629	7	-2.69E+01	0.00E+00	error
22	AC-1064	AC-865	0	9.51E+00	AC-626	5	-1.75E+01	0.00E+00	error
23	AC-1065	AC-862	0	1.14E+01	AC-630	7	-2.48E+01	0.00E+00	error

Valores negativos indican menor probabilidad de que el asignado padre o madre sean los verdaderos (error), 2 niveles de confianza: el relajado+ (al 80% de confianza) y el estricto* (al 95% de confianza loci mist = numero de Loci que no coinciden entre la cría y el parental.

7. DISCUSIÓN

En los programas de mejoramiento genético animal, el efectuar cruces dirigidos permite formar rebaños homogéneos con características productivas similares. Tal es el caso del Centro Piloto de Mejoramiento Genético Munay Paqocha y el Fundo Itita, cuya formación tuvo como finalidad generar núcleos de reproductores de alpacas huacayas blancas orientadas a obtener mejoras en la finura de la fibra. Sin embargo, la reducción del tamaño efectivo de una población conlleva a la disminución del número de alelos, observando la pérdida de aquellos que se encuentran en frecuencias muy bajas debido al efecto de la deriva génica.

Los 10 marcadores utilizados en este trabajo mostraron un alto nivel de variabilidad alélica, de los cuales 7 fueron descritas previamente por Agapito *et al.* (2008) como útiles para los estudios de variabilidad, mientras que los otros tres marcadores VOLP92, LCA94, LCA90 que fueron descritos previamente para estudios en camellos (Schulz *et al.*, 2005) y propuesto en este estudio, también mostraron ser útiles debido a su alto nivel de heterocigosidad observado en la población.

Si bien entre los rebaños no se observaron diferencias en el número de alelos, sin embargo estos valores sí fueron mayores comparado a lo descrito por La Manna *et al.* (2011) y Paredes *et al.* (2013), aunque menor a los descritos por Agapito *et al.* (2008), para los loci YWLL36, LCA5, LCA66, LCA08, YWLL44, LCA37, YWLL08 atribuido probablemente al mayor número de individuos analizados por población (n=329). De igual forma Barreta *et al.* (2012) informó que los marcadores con un mayor número de alelos fueron YWLL36, LCA5, LCA66, YWLL44 analizados en poblaciones de alpacas bolivianas (n=149). La diferencias entre los números de alelos encontrados en otros estudios y los analizados en el

presente trabajo expresa una tendencia particular de algunos de los microsatélites empleados a mutar más fácilmente y, de este modo, generar un número más alto de alelos tal como fue descrito para el locus YWLL08, con 26 alelos, si bien este locus presentó el mismo número de alelos (25) en ambos rebaños sin embargo se diferenciaron en el tipo de alelo. El conocimiento de las frecuencias alélicas poblacionales permite compararlas, así como el detectar la pérdida de la variabilidad y de posibles introgresiones o hibridizaciones entre especies (Kadwell *et al.*, 2001).

Ambos rebaños presentaron alelos exclusivos aunque con frecuencias muy bajas (<1.5%), debido probablemente a su reciente origen, ocasionado ya sea por la pérdida (deriva genética) o ganancia de pares de bases (mutación). Es importante recordar que la tasa de mutación de los microsatélites es mucho mayor que del resto del genoma nuclear, lo que permite que ocurran cambios en el número de las repeticiones y produciendo nuevos alelos. Así por ejemplo, para el marcador LCA37 la población de Munay Paqocha presentó los alelos exclusivos 128, 148, 154, mientras que el Fundo Itita presentó el alelo 166. La Manna *et al.* (2012) también reportó para este locus la presencia de un alto número de alelos exclusivos (130, 138, 148, 170) para la raza suri. Por otro lado, Bustamante *et al.* (2002) informaron sobre la presencia de alelos exclusivos para los loci YWLL08, YWLL36 en poblaciones argentinas de guanacos y llamas, mientras que en este estudio se registraron para el locus YWLL08 (131 para el Fundo Itita y 141 para el Centro Munay Paqocha). No obstante, es recomendable seguir identificando estos alelos en otras poblaciones y descartar si el tamaño de muestra resulta un parámetro importante en esta exclusividad a fin de considerarlos al momento de diseñar programas de mejoramiento y/o de conservación del material genético.

Existe una relación positiva entre el número de alelos efectivos, el nivel de polimorfismo (PIC) y heterocigosidad, registrado en este estudio. La Manna *et al.* (2012) también encontraron esta relación para 7 marcadores, de los 13 analizados, en poblaciones de alpacas procedentes de un centro de conservación. Además, todos los loci se encontraron en EHW excepto para el locus LCA 8 en individuos del rebaño Munay Paqocha, mostrando una ligera desviación luego de aplicar la corrección de Bonferroni, que es utilizada para corregir falsos positivos en pruebas múltiples. Sin embargo, la ligera desviación observada no afectó el resultado total de EHW, contrastándolo con el valor de Fis (LCA8 = 0,063), con lo cual se confirma el equilibrio del locus. Si bien existe una selección por manejo reproductivo para estos rebaños, sin embargo el equilibrio observado indicaría la ocurrencia de apareamientos entre individuos poco relacionados, con una presión selectiva mínima sobre la población, lo que sugiere que la estrategia de manejo utilizada en los rebaños tiene similar efecto sobre las frecuencias genotípicas a las esperadas bajo panmixia, sin evidenciar aún el efecto del apareamiento dirigido para los individuos del rebaño de Munay Paqocha.

Por otro lado, para el total de la población analizada, solo se encontró una desviación de EHW en los loci VOLP 92 y LCA8 sin utilizar la corrección de Bonferroni. Ésta es generada por la presencia de un déficit de heterocigotos en estos marcadores, debido quizás a posibles procesos de endogamia, selección en contra de heterocigotos, subdivisión poblacional (efecto Wahlund) o alelos nulos, e incluso por la combinación entre estos.

Los valores de F_{IS} estuvieron cercanos a cero para todos los loci (0,016), concordante a lo descrito por Agapito *et al.* (2008) para poblaciones de alpacas de Puno, Huancavelica y Junín ($F_{IS}=0,0141$) y por La Mana *et al.* (2011) para la población de la Estación Experimental Quimsachata-Puno ($F_{IS}= 0,01$), pero con valores menores a los encontrados por Paredes *et al.* (2013) en poblaciones de Arequipa y Puno ($F_{IS}=0,15252$). De igual forma, los valores de F_{ST} (0,003) cercanos a cero (que explica el efecto Wahlund asociado a una reducción de heterocigosidad en una población causada por una estructura subpoblacional) indican la existencia de la poca diferenciación entre los rebaños. Los valores F fueron menores a los descritos en otras poblaciones de camélidos domésticos de Argentina, Bolivia y Perú (Barreta *et al.*, 2012; Bustamante *et al.*, 2006; Paredes *et al.*, 2012). Estos resultados estarían asociados al tipo de manejo que ocurre en estos rebaños, basado en el intercambio de machos entre criadores.

A pesar de la presión de la selección reproductiva que existe en las poblaciones de estos rebaños reproductores, los individuos presentaron alto grado de variabilidad genética.

Otra causa que podría explicar el déficit de heterocigotos en una población, es la presencia de alelos nulos, que puede ser ocasionado como un error en la amplificación por PCR de ciertos alelos (condiciones de PCR no adecuadas, presencia de regiones de unión de los cebadores con mutaciones, etc.), dando como resultado que algunos heterocigotos sean genotipificados como homocigotos; sin embargo en este estudio no se mostraron la presencia de alelos nulos.

El conocimiento de la diversidad genética en poblaciones domésticas permite evaluar el estado actual de las mismas. En los últimos años se ha informado

sobre la pérdida de la variabilidad de razas locales (Barker 1999; FAO, 2010), por lo que se recomienda diseñar planes de mejoramiento más adecuados para evitar la disminución de la diversidad genética y por ende la capacidad de tolerar a cambios ambientales, procurando de este modo la mejora en la producción pecuaria. En ese aspecto, la diversidad genética expresada como heterocigosidad esperada (H_e) descritas para el total de la población, guarda relación con los resultados obtenidos por Barreta *et al.* (2012) en alpacas de Bolivia, pero mayor ($H_e = 0.849 \pm 0.043$) a lo informado tanto en trabajos anteriores para la especie (Agapito *et al.*, 2008, La Manna *et al.*, 2011, Paredes *et al.*, 2011), así como en otras especies domésticas (Ema *et al.*, 2014).

Por otro lado, los niveles de heterocigosidad observados (H_o) fueron inversos entre los rebaños de alpacas analizados. Es así que el rebaño del Fundo Itita presentó una mayor H_o (0.858 ± 0.059) respecto a la H_e (0.848 ± 0.039), mientras que el rebaño del Centro Munay Paqocha presentó un menor valor de la H_o (0.815 ± 0.070) respecto a la H_e (0.848 ± 0.049). Esto también se reflejó en los valores de F_{IS} ; siendo positivo para Munay Paqocha (0,039) e indicando un déficit de heterocigotos, y negativo para Itita (-0.012) indicando un exceso de estos. Estos altos valores registrados podrían ser el producto de la introducción constante de machos pertenecientes a diferentes acervos genéticos, de tal forma que generan una diversidad artificial y sobreestimada.

Si bien en este estudio no se detectaron altos niveles de endogamia y la mayoría de marcadores mostraron exceso de heterocigotos, el rebaño del Centro Munay Paqocha presentó una tendencia al déficit de heterocigotos, propenso a incrementar el nivel de endogamia, dependiendo del tipo de sistema de cruzamientos que se maneje en el centro. En este contexto, el mantener un bajo

grado de endogamia en las poblaciones resulta importante ya que los altos niveles de consanguinidad van a afectar al fenotipo, y estar relacionada con la aparición de malformaciones congénitas y problemas reproductivos (Huanca *et al.*, 2007).

Uno de los principales requerimientos para la aplicación de las estrategias de mejoramiento genético exitosas, es el conocimiento de la paternidad de los individuos a fin de generar registros genealógicos confiables. La precisión de la selección dependerá en gran medida de la calidad y cantidad de los registros de rendimiento y genealógicos disponibles. Igualmente, el establecimiento de un servicio de pruebas de paternidad resulta de utilidad para los criadores de ganado en la medida en que les permite resolver problemas asociados a la falta o incorrecta asignación de identidad de los animales pertenecientes a un hato. Así, el uso de marcadores microsatélites para estudios de paternidad en animales otorga un mayor grado de confianza en el diagnóstico, en comparación con los análisis de los grupos sanguíneos antes utilizados (Forbes, 1951), ya que brinda un gran poder de discriminación, con alta probabilidad de diferenciar a dos individuos como los posibles padres. En este sentido, los 10 marcadores utilizados en este estudio presentaron una probabilidad de exclusión adecuada, con un valor superior al 99,9% cuando se conoce el genotipo de ambos padres. Similares valores se obtienen en estudios de exclusión para poblaciones humanas, llamas, guanacos y bovinos (Bustamante *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2005; Ossa *et al.*, 2010; Montoya *et al.*, 2010). De acuerdo a los valores de PE-2, se determina que se puede alcanzar un valor PEC de 0,999 con solo considerar los marcadores YWLL08, YWLL44, LCA37, YWLL36, LCA8; siendo YWLL08 el marcador por excelencia para este tipo de pruebas (0,885). Entre más alto sean

los valores PEC, mayor será la probabilidad de exclusión combinada para el marcador en cuestión (Marshall *et al.*, 1998), y está relacionada al número de alelos por locus y PIC. Todas estas propiedades nos permiten proponer al panel de marcadores utilizados en este estudio como útiles para resolver casos de paternidad.

La prueba de paternidad realizada permitió detectar la presencia de mayores errores de asignación de maternidad y paternidad en el rebaño Fundo Itita, en comparación con el Centro de Munay Paqocha. Itita presentó un 13,04% de asignaciones maternas incorrectas y un 30,4% de asignación paterna errónea, mientras que Munay Paqocha presentó menores errores de designación de maternidad (7,69%) y de paternidad (17,95%). Además, los porcentajes fueron mayores a los encontrados por Agapito *et al.* (2008) indicando un 15,5% de error de paternidad y 4,44% error de maternidad. Estos errores de designación reflejan los problemas existentes en los rebaños ocasionados por la pérdida de aretes, el asignamiento basado en la cercanía de la cría a la supuesta madre, diferencias del sistema de apareamientos utilizadas entre los rebaños; es decir se refleja la falta de una infraestructura adecuada en el Fundo Itita que impide el control de los apareamientos de forma eficiente. Todos estos factores, al generar registros erróneos, pueden tener un gran impacto sobre la eficiencia de las pruebas de progenie y de la exactitud en la estimación de los valores de cría.

En este sentido, se refleja la importancia del monitoreo de la diversidad genética que permitirá conocer los cambios genéticos poblacionales y el efecto de la selección artificial en los rebaños con el paso del tiempo.

8. CONCLUSIONES

- Los rebaños Munay Paqocha (0,815) y el Fundo Itita (0,858) poseen altos y similares niveles de heterocigosidad, aunque con una tendencia al déficit de heterocigotos en el Centro Munay Paqocha ($F_{IS} = 0,039$) y al exceso en Itita ($F_{IS} = -0,012$).
- La presencia de alelos único en los loci LCA37, LCA90, LCA5, VOLP92, YWLL36, YWLL44, YWLL08, permite su aplicación para estudios de diferenciación entre poblaciones de alpacas.
- Es posible obtener un acierto de paternidad al 99,9% considerando sólo los loci YWLL08, YWLL44, LCA37, YWLL36, LCA8, con mayores probabilidades de exclusión.
- El alto poder de discriminación y contenido polimórfico del marcador YWLL08 resulta útil para estudios de diversidad genética, identificación de individuos y determinación de paternidad en alpacas.
- El Fundo Itita presentó el mayor número de asignaciones maternas (13,04%) y paternas incorrectas (30,4%), respecto al Munay Paqocha (7,69% y 17,95% respectivamente), lo que demuestra un inadecuado registro de los empadres.

9. RECOMENDACIONES

- Es necesario evaluar las siguientes generaciones para observar cambios a largo plazo causados por la selección artificial.
- Se recomienda el uso de estos marcadores para determinar la variabilidad genética poblacional en camélidos a nivel nacional.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGAPITO J., RODRÍGUEZ J., HERRERA-VELIT P., et al. Parentage testing in alpacas (*Vicugna pacos*) using semi-automated fluorescent multiplex PCRs with 10 microsatellite markers. *Animal Genetics*, 2008, Vol. 39, No 2, p. 201-203.
2. ARANGUREN-MENDEZ J. & JORDANA J. Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción. *Asociación Venezolana de Producción Animal*, 2001.
3. ARCOT S. S., Alu repeats: a source for the genesis of primate microsatellites. *Genomics*, 1995, Vol. 29, No 1, p. 136-144.
4. BARRETA J., IÑIGUEZ V., SAAVEDRA V. et al. Genetic diversity and population structure of Bolivian alpacas. *Small Ruminant Research*. 2012, Vol.105, No 1, p. 97-104.
5. BARKER J. S. F. Conservation of livestock breed diversity. *Animal Genetic Resources Information*, 1999, Vol. 25, p. 33-43.
6. BEAUMONT M. A. & BRUFORD M. W. . Microsatellites in conservation genetics. *Microsatellites. Evolution and applications*, 1999, p. 165-182.
7. BOTSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICK M. & DAVIS R.W.. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 1980, Vol. 32, No 3, p. 314.
8. BRENES E. R. El clúster de los camélidos en el Perú: diagnóstico competitivo y recomendaciones estratégicas. INCAE, 2001
9. BRIONES I. & VALDIVIA V. Defectos anatómicos en el camélido sudamericano doméstico. *IDESIA (Chile)*, 1985, Vol. 9.p. 41-44.
10. BROWNSTEIN M. J., CARPTEN J. D. & SMITH J. R.. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques*, 1996, Vol. 20, No 6, p. 1004-6, 1008-10.
11. BUCHANAN F. C., MAIERS L. D., THUE T. D., DE MARCH B. G. E & STEWART R. E. A. Microsatellites from the Atlantic walrus *Odobenus rosmarus rosmarus*. *Molecular Ecology*, 1998, vol. 7, no 8, p. 1083-1085.

12. BUCKLETON J. & GILL P.. Low copy number. En: *Forensic DNA evidence interpretation*, 2005, p. 275-297.
13. BUSTAMANTE A. V., MATÉ M. L. , ZAMBELLI A. & VIDAL-RIOJA L. Isolation and characterization of 10 polymorphic dinucleotide microsatellite markers for llama and guanaco. *Molecular Ecology Notes*, 2003, Vol. 3, No 1, p. 68-69.
14. BUSTAMANTE A. V., ZAMBELLI A., DE LAMO D. A., VON THUNGEN J., & VIDAL-RIOJA L. Genetic variability of guanaco and llama populations in Argentina. *Small Ruminant Research*. 2002, Vol. 44, p.97-101.
15. BUSTAMANTE A. V., MATÉ M. L., LAMAS H. E., GIOVAMBATTISTA G., ZAMBELLI A. & VIDAL-RIOJA L. Análisis de diversidad genética en tres poblaciones de llamas (*Lama glama*) del noroeste argentino. *Rev. chil. hist. nat.* 2006, Vol.79, No 2 pp. 175-184
16. BUTLER J. M. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. United States of America: Elsevier Academic Press, 2005. 627 p. ISBN 0-12-147952-8.
17. BUTLER J. M. Fundamentals of forensic DNA typing. United States of America: Elsevier Academic Press, 2009. 485 p. ISBN: 978-0-12-374999-4
18. CARLING M.D., WISEMAN P. A., BYERS J.A. Microsatellite analysis reveals multiple paternity in a population of wild pronghorn antelopes (*Antilocapra americana*). *Journal of Mammalogy*, 2003, Vol. 84, No 4, p. 1237-1243.
19. CENAGRO 2012. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA E INFORMATICA *Resultados Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario 2012*
20. CRAWFORD A. M., et al. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics*, 1995, Vol. 140, No 2, p. 703-724.
21. CHAKRABORTY R., ANDRADE M. D., DAIGER S. P., & BUDOWLE B. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics*, 1992, Vol. 56, No 1, p. 45-57.
22. CHAMBERS G. K. & MACAVOY E. S. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, Vol. 126, No 4, p. 455-476.
23. CHAPUIS M.P. & ESTOUP A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, Vol. 24, No 3, p. 621-631

24. CHENG H. H. & CRITTENDEN L. B. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*, 1994, Vol. 73, No 4, p. 539-546.
25. CHIKHI L., GOOSSENS B., TREANOR A., & BRUFORD M. W. Population genetic structure of and inbreeding in an insular cattle breed, the Jersey, and its implications for genetic resource management. *Heredity*, 2004, Vol. 92, No 5, p. 396-401.
26. CROW J.F., & KIMURA M. An introduction to population genetics theory. 1970. Harper and Row Publishers Inc New York.
27. DAKIN E. E. & AVISE J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 2004, Vol. 93, No 5, p. 504-509.
28. DI ROCCO F., POSIK D. M., RIPOLI M. V., DÍAZ S., MATÉ M. L., GIOVAMBATTISTA G., & VIDAL-RIOJA L. South American camelid illegal traffic detection by means of molecular markers. *Legal Medicine*, 2011, Vol. 13, No 6, p. 289-292.
29. DIETRICH W. F., et al. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*, 1996, Vol. 380, No 6570, p. 149-152.
30. EGITO A. A., PAIVA S. R., MARIA DO SOCORRO M., MARIANTE A. S., ALMEIDA L. D., CASTRO S. R., & GRATTAPAGLIA D. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC genetics*, 2007, Vol. 8, No 1, p. 83.
31. EMA P.N, et al. Genetic diversity of four Cameroonian indigenous cattle using microsatellite markers. *Journal of Livestock Science*. 2014, Vol. 5, p. 9-17.
32. FAO. 2005 .Situación Actual de los Camélidos Sudamericanos en Perú.
33. FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma (disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>) (traducción de la versión original en inglés, 2007).
34. FORBES G. Blood Groups and Disputed Paternity. *British medical journal*, 1951, Vol. 2, No 4725, p. 227.
35. FRANKHAM R., BRISCOE D. A., BALLOU J. D. Introduction to Conservation Genetics. United Kingdom: Cambridge University Press. 2002. 617p. ISBN 0-521-63985-9 (paperback), 0-521-63014-2 (hardback).

36. GAGNEUX P., BOESCH C., WOODRUFF D. S. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*, 1997, Vol. 6, No 9, p. 861-868.
37. GOUDET J. FSTAT, version 2.9.3. A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. *Journal Heredity*. 1995, Vol 86, No, p. 487-488
38. GARBER R. A. & W. MORRIS J. General equations for the average power of exclusion for genetic systems of n codominant alleles in one-parent and no-parent cases of disputed parentage. *Inclusion Probabilities in Parentage Testing*, 1983, p. 277-280.
39. GUNDEL H. & REETZ I. Exclusion probabilities obtainable by biochemical polymorphisms in dogs. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, 1981, Vol. 12, No 2, p. 123-132.
40. GUO S. W. & THOMPSON E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 1992, p. 361-372.
41. HALDANE J. B. S. An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics*, 1954, vol. 52, no 3, p. 631-635.
42. HARTL D. L. & CLARK A.G. Principles of Population Genetics. 1989. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
43. HEARNE C. M., GHOSH S., TODD J. A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*, 1992, Vol. 8, No 8, p. 288-294.
44. HIJMANS R. J., GUARINO L., BUSSINK C., MATHUR P., CRUZ M., BARRENTES I. & ROJAS E. DIVA-GIS. Vsn. 5.0. *A geographic information system for the analysis of species distribution data*. (2004).
45. HUANCA T., APAZA N., SAPANA R. Defectos congénitos y hereditarios visibles en alpacas de dos zonas representativas de la región de Puno. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 2007, Vol. 15, p. 480.
46. ISAGI Y. & SUHANDONO S. PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology*, 1997, Vol. 6, No 9, p. 897-899.
47. JAMIESON A., et al. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*, 1997, Vol. 28, No 6, p. 397-400
48. JIANLIN H. & TAYLOR C. S. Application of New World Camelidae microsatellite primers for amplification of polymorphic loci in Old World Camelids.. *Animal Genetics*, 2000, Vol. 31, p. 404-419.

49. JONES D. A. Blood samples: probability of discrimination. *Journal of the Forensic Science Society*, 1972, Vol. 12, No 2, p. 355-359.
50. KADWELL M., FERNANDEZ M., STANLEY H. F., BALDI R., WHEELER J. C., ROSADIO R., & BRUFORD M. W. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2001, Vol. 268, No 1485, p. 2575-2584.
51. KALINOWSKI S. T., TAPER M. L., MARSHALL T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology*, 2007, Vol. 16, No 5, p. 1099-1106.
52. KLOOSTERMAN A. D. & KERSBERGEN P. Efficacy and limits of genotyping low copy number DNA samples by multiplex PCR of STR loci. En *International Congress Series*. Elsevier, 2003. p. 795-798.
53. LANG K. D. M., WANG Y., PLANTE Y. Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llamas and alpacas. *Animal Genetics*, 1996, Vol. 27, No 4, p. 293-293.
54. LA MANNA V., LA TERZA A., GHEZZI S. et al. Analysis of genetic distance between Peruvian Alpaca (*Vicugna pacos*) showing two distinct fleece phenotypes, Suri and Huacaya, by means of microsatellite markers. *Italian Journal of Animal Science*. 2011, Vol. 10, No 60, p. 271-276
55. LAVAL G., et al. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetics Selection Evolution*, 2000, Vol. 32, No 2, p. 187-204.
56. MARIN J. C., et al. Mitochondrial phylogeography and demographic history of the Vicuñas: implications for conservation. *Heredity*. 2007. Vol. 99, p. 70-80.
57. MARIN J. C., SAUCEDO C. E., CORTI P. & GONZALEZ B. A. Application of DNA forensic techniques for identifying poached guanacos (*Lama guanicoe*) in Chilean Patagonia. *Journal of Forensic Sciences*, 2009, Vol. 54, No 5, p. 1073-1076.
58. MARSHALL T. C., SLATE J. B. K. E., KRUUK L. E. B. & PEMBERTON J. M. . Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 1998, Vol. 7, No 5, p. 639-655.
59. MATE M. L., BUSTAMANTE A., GIOVAMBATTISTA G., LAMO D. D., THÜNGEN J., ZAMBELLI A. & VIDAL-RIOJA L. Genetic diversity and

- differentiation of guanaco populations from Argentina inferred from microsatellite data. *Animal Genetics*, 2005, Vol. 36, No 4, p. 316-321
60. MBURU D. N., OCHIENG J. W., KURIA S. G., JIANLIN H., KAUFMANN B., REGE J. E. O. & HANOTTE O. Genetic diversity and relationships of indigenous Kenyan camel (*Camelus dromedarius*) populations: implications for their classification. *Animal Genetics*, 2003, Vol. 34, No 1, p. 26-32.
61. McPARTLAN H. C., MATTHEWS M. E., ROBINSON N. A. Alpaca microsatellites at the VIAS A1 and VIAS A2 loci. *Animal Genetics*, 1998, Vol. 29, No 2, p. 158.
62. MARTÍNEZ A. M., VEGA-PLA J. L., BRAVO M. J., BARBA C., CARABALLO J. & DELGADO J. V. Caracterización genética de la oveja Palmera con microsatélites. *Archivos de Zootecnia*, 2005, Vol. 54, No 206, p. 363-367.
63. MONTOYA A. E., CERÓN MUÑOZ M. F., MORENO M. A., MARTÍNEZ E., CORRALES J. D., TIRADO J. F. & CALVO S. J. Genetic characterization of the Hartón del Valle, Angus, Brangus, Holstein, and Senepol cattle breeds in Colombia, using ten microsatellite markers. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2010, Vol. 23, No 3, p. 283-291.
64. MORETTI T. R., BAUMSTARK A. L., DEFENBAUGH D. A., KEYS K. M., BROWN A. L. & BUDOWLE B. Validation of STR typing by capillary electrophoresis. *Journal of Forensic Sciences*, 2001, Vol. 46, No 3, p. 661-676.
65. MULLIS K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de biologie clinique*. 1990. Vol 48, No 8, p. 579.
66. MUNYARD K.A., LEDGER J.M., LEE C.Y., BABRA C., GROTH D.M., Characterization and multiplex genotyping of alpaca tetranucleotide microsatellite markers. *Small Ruminant Research*. 2009, Vol 85, No 2-3, p.153-156.
67. NEI M. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.1987.
68. OBREQUE V., COOGLE L., HENNEY P J., BAILEY E., MANCILLA R., GARCIA-HUIDOBRO J., HINRICHSEN P., COTHRAN E.G. Characterization of 10 polymorphic alpaca dinucleotide microsatellites. *Animal Genetics*, 1998, Vol. 29, No 6, p. 461-462.

69. OBREQUE V., MANCILLA R., GARCIA-HUIDOBRO J., COTHRAN E.G, HINRICHSEN P. Thirteen new dinucleotide microsatellites in Alpaca. *Animal Genetics*, 1999, Vol. 30, No 5, p. 397-398.
70. OLIVEIRA E. J., PÁDUA J. G., ZUCCHI M. I., VENCovsky R., & VIEIRA M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 2006, Vol. 29, No 2, p. 294-307.
71. OSSA H., TASCÓN E. P., MORENO H. A., HORTA J., & MORENO G. Frecuencias alélicas de 14 STR's autosómicos en una población de Antioquia, Colombia. *NOVA publ. cient*, 2010, Vol. 8, No 13, p. 25-29
72. PAREDES M.M, MEMBRILLO A., AZOR P. J., MACHACA J. E., TORRES D., & SERRANO, A. M. Genetic and phenotypic variation in five populations of Huacaya Alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *Small Ruminant Research*. 2013, Vol. 111, No 1-3, p. 31-40.
73. PARISSET L., SAVARESE M. C., CAPPuccio I. & VALENTINI A. Use of microsatellites for genetic variation and inbreeding analysis in Sarda sheep flocks of central Italy. *J. Anim. Breed. Genet*, 2003, Vol. 120, p. 425-432.
74. PENEDO M. C. T.; CAETANO A. R.; CORDOVA K. I. Microsatellite markers for South American camelids. *Animal Genetics*, 1998, Vol. 29, p. 411-412
75. PENEDO M. C. T.; CAETANO A. R.; CORDOVA K. I. Six microsatellite markers for South American camelids. *Animal genetics*, 1999, Vol. 30, No 5, p. 399-399.
76. POMPANON F., BONIN A., BELLEMAIN E. & TABERLET P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 2005, vol. 6, no 11, p. 847-846.
77. PONZONI R. W. Manual de prácticas de manejo de alpacas y llamas. *Estudio Producción y Sanidad Animal*. Rome, Italy: Vol. 130. FAO; 1996.
78. PRIMMER C. R. & MERILÄ J. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. *Conservation Genetics*, 2002, Vol. 3, No 4, p. 445-449.
79. RAYMOND M. & ROUSSET F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity*, 1995, Vol. 86, No 3, p. 248-249.

80. ROUSSET F. Genepop'007: A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 2008, Vol. 8, No 1 p.103-106
81. REED K. M. & CHAVES L. D. Simple sequence repeats for genetic studies of alpaca. *Animal Biotechnology*, 2008, Vol. 19, No 4, p. 243-309.
82. RICE W.R. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 1989, Vol. 41, p. 223-235.
83. ROUSSET F. & RAYMOND M. Testing Heterozygote Excess and Deficiency. *Genetics*. 1995, Vol.140, p. 1413-1419.
84. SAMBROOK J. & RUSSELL D., W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
85. SASSE J., MARIASEGARAM M., BABU R., KINNE J. & WERNERY U. South American camelid microsatellite amplification in *Camelus dromedarius*. *Animal Genetics*, 2000, Vol. 31, No 1, p. 75-76.
86. SARNO R. J, DAVID V. A., FRANKLIN W. L., O'BRIEN S. J. & JOHNSON W. E. Development of microsatellite markers in the guanaco, *Lama guanicoe*: utility for South American camelids. *Molecular Ecology*, 2000, Vol. 9, No 11, p. 1922- 1924.
87. SARNO R. J. FRANKLIN W. L., O'BRIEN S. J. & JOHNSON W. E. Patterns of mtDNA and microsatellite variation in an island and mainland population of guanacos in southern Chile. *Animal Conservation*, 2001, Vol 4, No 2, p.93–101.
88. SARNO R. J, VILLALBA L., BONACIC C., GONZALEZ B., ZAPATA B., MAC DONALD D. W. O'BRIEN S.J., & JOHNSON W. E. Phylogeography and subspecies assessment of vicuñas in Chile and Bolivia utilizing mtDNA and microsatellite markers: implications for vicuña conservation and management. *Conservation Genetics*, 2004, Vol 5, p. 89–102.
89. SHINDE D., LAI Y., SUN F. & ARNHEIM N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT) n and (A/T) n microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 2003, Vol. 31, No 3, p. 974-980.
90. SCHULZ U., MINGUEZ Y., CHECA M. L., GARCIA-ATANCE P., DUNNER, S., GARCIA D. & CAÑÓN J. The Majorero camel (*Camelus dromedarius*) breed. *Animal Genetic Resources*. 2005, Vol 36, p. 61-72.

91. SMALLDON K. W. & MOFFAT A. C. The calculation of discriminating power for a series of correlated attributes. *Journal of the Forensic Science Society*, 1973, Vol. 13, No 4, p. 291-295.
92. STANLEY H., KADWELL M., WHEELER J.C. Molecular Evolution of the Family Camelidae: A Mitochondrial DNA Study. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 1994, Vol. 256, p. 1-6.
93. TOLONE M., MASTRANGELO S., ROSA A. J. M. & PORTOLANO B. Genetic diversity and population structure of Sicilian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Ruminant Research*, 2012, Vol. 102, No 1, p. 18-25.
94. VELARDE J.L. Consanguinidad y su importancia en el mejoramiento genético de la alpaca. *Sistema de Revisiones en Investigación*. 2011. Veterinaria de San Marcos. Disponible en internet: http://www.unmsm.edu.pe/veterinaria/files/Articulo_vilela_velarde.pdf.
95. VIDAL-RIOJA L., ZAMBELLI A., SEMORILE L. An assessment of the relationships among species of Camelidae by satellite DNA comparisons. *Hereditas*, 1994, Vol. 121, No 3, p. 283-290
96. WALSH P. S, FILDES N. J., REYNOLDS R. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research*, 1996, Vol. 24, No 14, p. 2807-2812.
97. WEIR B.S. (1996). Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
98. WEBER J. L. Informativeness of human DNA (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 1990. Vol. 7, p. 524-530,
99. WHEELER J. C. Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1995, Vol. 54, No 3, p. 271-295.
100. WHEELER J. C., CHIKHI L., BRUFORD M. W. Genetic analysis of the origins of domestic South American camelids. *Archaeology and Animal Domestication: New Genetic and Archaeological Paradigms*, (University of California Press, Berkeley, CA. (Ed. by M.Zeder), 2006. p. 329–41
101. WRIGHT S., 1965. The interpretation of population structure by F- statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, Vol19, No 3, 395–420.
102. YALTA E., VIVANCO W., VELI E., Análisis genético poblacional de alpacas huacaya (Vicugna pacos) de la región Puno utilizando SSR. En: Congreso

Mundial De Camélidos Sudamericanos. Conferencias, Resúmenes y Trabajos.
21-23 Noviembre 2012, Arica-Chile.

11. GLOSARIO

- **ADN (ácido desoxirribonucleico).** Ácido nucléico compuesto de dos cadenas polinucleotídicas que se disponen alrededor de un eje central formando una doble hélice, capaz de auto-replicarse y codificar la síntesis de ARN. La molécula de ADN está formada por dos cadenas antiparalelas y complementarias entre sí. Su unidad básica, el nucleótido, consiste en una molécula del azúcar desoxirribosa, un grupo fosfato, y una de las cuatro bases nitrogenadas: adenina, timina, citosina y guanina.
- **Alelo.** Una de dos o más formas alternativas de un gen (o región de ADN tal como los STRs), presentando cada cual una secuencia nucleotídica única. En células diploides, está presente un máximo de dos alelos, en la misma posición relativa o locus en cromosomas homólogos.
- **Alelos nulos en loci microsatélites.** Alelos que no dan productos en la PCR debido a mutaciones (delección o sustitución de base) que ocurre en uno o ambos sitios de anillamiento del cebador.
- **Alelos exclusivos.** Alelos de muy baja frecuencia en una población.
- **Anillamiento o Hibridación.** Apareamiento de una mezcla de dos ácidos nucleicos de cadena simple complementarios para formar ácidos nucleicos de cadena doble. Unión de cadenas simples de ADN que se aparean debido a que comparten algunos pares de bases complementarias.
- **Desequilibrio de ligamiento.** Propiedad de algunos genes de las poblaciones genéticas de no segregarse de forma independiente, esto es, poseen una frecuencia de recombinación menor del 50%. Esto suele deberse a que los dos loci implicados se encuentran en el mismo cromosoma, lo que imposibilita su transferencia a la progenie de manera aleatoria con la separación de los cromosomas en anáfase.
- **Endogamia.** cruzamiento entre individuos de una misma raza dentro de una población aislada, tanto geográfica, como genéticamente
- **Electroforesis.** Proceso de separar moléculas cargadas a través de la matriz de un gel mediante la aplicación de un campo eléctrico. La matriz del gel tiene un efecto de tamiz el cual permite que las moléculas sean separadas sobre la base de su tamaño, mientras el campo eléctrico separa las moléculas sobre la base de su carga.
- **Extracción de ADN.** Proceso mediante el cual el ADN es purificado a partir de células.
- **Frecuencia alélica.** Frecuencia con la cual una forma de un gen (alelo) está presente dentro de una población.
- **Fluoróforos.** Una molécula que es capaz de fluorescer.
- **Ganancia Genética.** Población nueva que se crea por selección, su valor genético medio difiere del valor de la población original. Esta diferencia es la

«ganancia genética» específica del método e intensidad de selección empleada en un programa de mejora genética particular.

- **Genotipo.** Composición alélica específica de un organismo, del genoma entero o más comúnmente de un gen o conjunto de genes. La información desde la cual los genotipos son desarrollados puede incluir a alelos de alozimas, microsatélites o información de secuencia.
- **Hato.** Conjunto de animales de ganado mayor o menor.
- **Heterocigosidad.** Proporción de individuos que son heterocigotos en una población. La heterocigosidad media es calculada como el número de individuos heterocigotos para cada gen dividido por el número total en la muestra promediado entre todos los loci analizadas. Esto es la heterocigosidad observada (H_o). La heterocigosidad esperada (H_e) es calculada de la fórmula para el equilibrio de Hardy-Weinberg basada en las frecuencias alélicas.
- **Heterocigoto.** Presencia de dos alelos diferentes en un individuo para un locus.
- **Homocigoto.** Presencia de dos alelos idénticos en un individuo para un locus.
- **Locus (Loci, pl.).** Posición de un gen o segmento cromosómico en un cromosoma. Los alelos están localizados en loci idénticos de cromosomas homólogos.
- **Marcador genético.** Algún rasgo usado como marcador de variación genética entre y dentro de individuos y taxa. Los rasgos usados incluyen rasgos fenotípicos (por ejemplo color de ojos), proteínas (por ejemplo alozimas y albúmina) y segmentos de ADN (por ejemplo microsatélites). Característica (genética) heredable que puede ser reconocido en un individuo examinado y es usado en diferenciar individuos relacionados genéticamente de individuos no relacionados.
- **Mutación.** Cambio detectable y heredable (delección, inserción o sustitución de base) en una secuencia de ADN.
- **Par de bases (pb).** Dos bases nitrogenadas [adenina (A) y timina (T) o guanina (G) y citosina (C)] unidas por enlaces de hidrógeno. Dos cadenas complementarias de ADN son mantenidas unidas en la forma de una doble hélice mediante las uniones entre pares de bases. Hay dos posibles pares de bases $A=T$ y $C\equiv G$.
- **PCR Múltiplex.** Combinación de dos o más loci STRs durante la amplificación y análisis. Todos los loci STRs múltiplex son amplificados simultáneamente en un solo tubo. Además, debido a que cada locus STR tiene un rango de tamaño limitado de alelos conocidos, varios loci STR son detectados simultáneamente en regiones limitadas y bien definidas del mismo carril en un gel.
- **Perfil genético.** Colección de información acerca de los genes de una persona.
- **Población.** Colección de individuos que tienen características específicas (alelos comunes de loci polimórficos) presentes en equilibrio de Hardy-Weinberg.

- **Poder de Discriminación (PD).** Número promedio de personas que deberían ser muestreadas antes de encontrar el mismo patrón de ADN de un individuo seleccionado al azar.
- **Polimorfismo.** Presencia simultánea de dos o más formas alélicas entre los individuos de una población. Variaciones de la secuencia del ADN.
- **Primer (Cebador).** Secuencia corta de ADN de cadena simple (oligonucleótido) la cual se une a una secuencia complementaria e inicia la extensión de las regiones de ADN adyacentes (síntesis de la cadena de ADN, por ejemplo en PCR) usando una ADN polimerasa. Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos actúan como cebadores para la síntesis *in Vitro* de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq* polimerasa. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermophilus aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85 ° C).
- **Valor de Cría.** Es una medida de la performance esperada (superioridad) de un animal con referencia al promedio de la población.
- **Zarco, ojo.** Se caracteriza por el color blanco azulado de los ojos, siendo frecuente en los rebaños de color blanco

ANEXOS

ANEXO I. Condiciones de amplificación en sistemas multiplex y simples para los 10 marcadores SSR.

REACTIVOS	Con. Stock	Conc. Final
MULTIPLEX : (YWLL36, LCA5,LCA8, LCA37, LCA66, LCA94)		
H2O MQ		
BUFFER	10 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.4 mM
MgCl ₂	50 mM	2 mM
CEBADOR F: YWLL36, LCA66	20 µM	0.1 µM
CEBADOR R: YWLL36, LCA66	20 µM	0.1 µM
CEBADOR F: LCA5, LCA37, LCA8, LCA94	20 µM	0.2 µM
CEBADOR R: LCA5, LCA37, LCA8, LCA94	20 µM	0.2 µM
TAQ	5 U	0.5 U
ADN	10 ng/µL	
Volumen total		10 ul
SIMPLES: LCA90		
H2O MQ		
BUFFER	10 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.25 mM
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM
CEBADOR F: LCA90	20 µM	0.3 µM
CEBADOR R: LCA90	20 µM	0.3 µM
TAQ	5 U	0.2 U
ADN	10 ng/µL	
Volumen total	10 ul	
Dúplex : YWLL08, YWLL44		
H2O MQ		
BUFFER	10 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.25 mM
MgCl ₂	50 mM	2 mM
CEBADOR F: YWLL08, YWLL44	20 µM	0.2 µM
CEBADOR R: YWLL08, YWLL44	20 µM	0.2 µM
TAQ	5 U	0.35 U
ADN	10 ng/µL	
Volumen total	10 ul	
SIMPLES 2: (VOLP92)		
H2O MQ		
BUFFER	10 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.4 mM
MgCl ₂	50 mM	3 mM
CEBADOR F: VOLP92	20 µM	0.5 µM
CEBADOR R: VOLP92	20 µM	0.5 µM
TAQ	5 U	0.35 U
ADN	10 ng/µL	
Volumen total	10 ul	

ANEXO II. Concentraciones de ADN final (diluciones) de muestras de sangre y folículos pilosos

CODIGO	(ng/μL)	CODIGO	(ng/μL)	CODIGO	(ng/μL)	CODIGO	(ng/μL)
AC-546a	11.93	AC-594B	9.82	AC-642b	10.10	AC-853	22.60
AC-547a	12.57	AC-595A	10.30	AC-643b	11.25	AC-854	21.18
AC-548b	11.94	AC-596A	7.07	AC-644b	7.80	AC-855	15.77
AC-549a	11.22	AC-597A	10.52	AC-645b	9.89	AC-857	3.92
AC-550a	9.64	AC-598A	13.08	AC-646b	11.52	AC-858	18.76
AC-551b	11.58	AC-599B	10.07	AC-647b	13.67	AC-859	131.20
AC-552a	10.28	AC-600B	8.20	AC-648b	9.83	AC-860	12.14
AC-553a	10.48	AC-601A	9.57	AC-649a	8.67	AC-861	11.33
AC-554a	13.14	AC-602A	10.85	AC-650b	8.88	AC-862	8.22
AC-555b	11.58	AC-603A	8.73	AC-651a	9.13	AC-863	15.87
AC-556a	8.68	AC-604A	7.43	AC-652a	8.22	AC-864	34.85
AC-557a	8.27	AC-605A	10.49	AC-653a	7.18	AC-865	16.12
AC-558b	8.27	AC-606A	7.32	AC-654a	7.71	AC-866	28.02
AC-559a	11.67	AC-607A	7.75	AC-655b	9.96	AC-867	11.13
AC-560b	10.87	AC-608A	6.64	AC-656b	9.47	AC-868	81.09
AC-561a	10.16	AC-609a	6.62	AC-657b	11.07	AC-871	19.98
AC-562a	7.68	AC-610b	7.04	AC-658a	9.81	AC-872	0.21
AC-563b	7.17	AC-611a	7.46	AC-659b	11.96	AC-873	3.29
AC-564b	12.49	AC-612a	6.79	AC-660b	9.32	AC-874	3.28
AC-565a	11.73	AC-613a	7.11	AC-661b	9.59	AC-875	6.03
AC-566a	16.51	AC-614a	7.68	AC-662a	8.97	AC-876	11.43
AC-567a	8.06	AC-615b	8.75	AC-663b	9.30	AC-877	5.38
AC-568b	7.27	AC-616a	11.84	AC-664a	8.09	AC-878	2.42
AC-569a	7.27	AC-617b	9.35	AC-665a	8.33	AC-879	7.15
AC-570b	17.16	AC-618b	8.44	AC-666b	10.88	AC-881	4.85
AC-571a	13.60	AC-619a	10.01	AC-667a	6.24	AC-882	3.55
AC-572a	8.41	AC-620a	9.75	AC-668a	8.28	AC-883	7.99
AC-573b	7.02	AC-621a	7.12	AC-669b	11.25	AC-884	9.38
AC-574a	13.89	AC-622a	9.12	AC-670a	7.81	AC-885	9.51
AC-575a	12.28	AC-623a	9.50	AC-671b	10.30	AC-886	9.96
AC-576a	10.64	AC-624b	7.04	AC-672b	5.07	AC-887	8.65
AC-577a	12.80	AC-625a	9.37	AC-673b	12.99		
AC-578a	12.57	AC-626b	9.91	AC-674a	10.11		
AC-579B	11.03	AC-627a	7.55	AC-675b	10.38		
AC-580A	10.90	AC-628b	10.64	AC-676a	11.01		
AC-581B	8.14	AC-629a	8.51	AC-677b	10.38		
AC-582A	7.76	AC-633a	7.63	AC-678b	8.92		
AC-583A	9.01	AC-630a	13.18	AC-679b	7.32		
AC-584A	12.56	AC-631a	8.74	AC-681a	10.60		
AC-585B	10.04	AC-632b	11.16	AC-682a	10.67		
AC-586A	10.28	AC-634b	12.39	AC-683a	9.65		
AC-587B	10.26	AC-635b	6.72	AC-840	89.57		
AC-588A	10.17	AC-636a	13.85	AC-841	31.59		
AC-589B	9.32	AC-637b	6.94	AC-842	23.79		
AC-590B	10.16	AC-638b	7.91	AC-849	2.19		
AC-591B	9.89	AC-639a	8.85	AC-850	82.38		
AC-592B	8.68	AC-640a	20.00	AC-851	36.39		
AC-593A	10.69	AC-641a	7.21	AC-852	12.65		

ANEXO III. Tablas de frecuencias alélicas (%) registradas para los marcadores SSRs en alpacas huacaya blancas del Centro Munay Paqocha (MP) y del Fundo Itita.

Marcador	Alelo (bp)	Rebaño Reproductor		Alelo (bp)	Rebaño Reproductor	
		MP	Itita		MP	Itita
LCA 37	128	1.5	-	148	2.0	-
	130	25.5	27.7	150	6.5	5.4
	132	13.0	13.3	152	18.5	14.5
	134	0.5	1.2	154	0.5	-
	136	7.0	7.2	156	1.0	1.2
	138	2.5	3.6	160	0.5	1.2
	140	3.0	8.4	162	1.0	0.6
	144	9.0	7.8	164	2.0	1.2
	146	6.0	5.4	166	-	1.2
LCA 05	182	3.0	6.6	196	1.5	1.2
	188	22.5	25.9	200	1.5	-
	190	1.5	0.6	202	33.5	28.9
	192	4.5	3.0	204	24.0	21.1
	194	4.0	6.6	206	4.0	6.0
LCA 66	217	4.0	3.0	237	2.0	3.0
	219	8.0	7.8	239	7.0	17.5
	221	19.5	13.9	241	1.5	1.2
	223	37.5	24.7	249	4.0	1.8
	225	4.5	5.4	251	2.5	0.6
	227	2.5	4.8	255	3.0	1.8
	233	4.0	14.5			
LCA 08	228	19.5	30.1	242	5.5	3.0
	234	17.0	16.9	246	9.5	6.6
	236	11.0	12.0	248	3.0	1.2
	238	11.5	6.6	250	6.5	7.2
	240	16.5	16.3			
LCA 90	229	9.5	13.3	249	6.0	8.4
	231	27.5	28.9	251	22.0	22.3
	233	5.0	7.8	253	2.5	0.6
	235	1.5	0.6	257	13.0	10.8
	237	3.5	3.0	259	3.5	1.8
	245	5.5	2.4	263	0.5	-

LCA 94	187	19.0	18.1			
	189	5.0	7.2			
	191	21.0	25.3			
	193	1.0	4.2			
	195	0.5	1.2			
	197	10.5	9.6			
	199	23.0	20.5			
	203	20.0	13.9			
VOLP92	191	8.5	4.8	203	37.5	38.0
	193	3.5	8.4	205	5.5	9.6
	195	1.5	1.2	207	6.5	13.3
	197	4.0	3.6	209	-	0.6
	199	7.5	3.0	211	4.0	5.4
	201	12.5	6.6	213	9.0	5.4
YWLL36	145	12.0	10.2	161	23.0	22.9
	147	17.5	18.1	165	5.5	1.8
	149	5.5	12.0	167	1.0	0.6
	151	3.5	1.2	169	1.5	2.4
	153	13.5	12.0	171	11.0	14.5
	157	0.5	-			
YWLL44	82	11.5	12.0	110	11.0	13.3
	90	2.5	-	114	1.5	-
	92	11.	12.7	116	12.0	4.8
	94	19.0	17.5	118	19.0	21.1
	102	4.0	12.0	124	0.5	-
	106	5.5	3.0	126	1.5	2.4
	108	1.0	1.2			
YWLL08	125	4.5	1.8	161	3.0	4.2
	131	1.0	-	163	1.5	3.6
	133	10.0	9.6	167	5.0	6.0
	135	2.0	0.6	169	5.5	5.4
	139	5.0	13.3	171	5.5	3.0
	141	-	0.6	173	1.5	0.6
	143	2.0	0.6	175	3.0	3.6
	147	9.0	9.6	177	7.5	1.2
	149	4.5	3.0	179	5.5	8.4
	151	3.5	6.6	181	3.0	4.2
	153	5.0	0.6	183	2.5	3.0
	155	6.5	7.2	185	1.5	1.2
	159	1.5	1.2	187	0.5	0.6
